

PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/42433
PCT/JP99/00066

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

SHAMOTO, Ichio
Yuasa and Hara
Section 206, New Ohtemachi Building
2-1, Ohtemachi-2-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 20 July 2000 (20.07.00)		
Applicant's or agent's file reference YCT-381		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP99/00066	International filing date (day/month/year) 12 January 1999 (12.01.99)	
Priority date (day/month/year)		
Applicant EBARA CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CA,EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 20 July 2000 (20.07.00) under No. WO 00/42433

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

20 July 2000 (20.07.00)

International application No.:

PCT/JP99/00066

Applicant's or agent's file reference:

YCT-381

International filing date:

12 January 1999 (12.01.99)

Priority date:

Applicant:

KARUBE, Isao et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

14 May 1999 (14.05.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

MAY 14 2001

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

TECH CENTER 1600/2900

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-381	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/00066	International filing date (day/month/year) 12 January 1999 (12.01.99)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/543		
Applicant EBARA CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 May 1999 (14.05.99)	Date of completion of this report 19 January 2000 (19.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-42, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 2-16, 18-32, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages 1, 17, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/14-14/14, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



11

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: A surface plasmon resonance immunosensor based on the streptavidin-biotin complex, (H. Morgan & D. M. Taylor), Biosensors & Bioelectronics, 1992, Vol. 7

Document 2: Analysis of interactions between organism molecules using the surface plasmon resonance phenomenon, (Setsuko Hashimoto), Bunseki, 1997, Vol. 5, pages 362-368 (in Japanese)

Document 3: JP, 1-109262, A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 26 April, 1989 (26.04.89)

Document 4: JP, 63-14691, A (The Regents of the University of California), 21 January, 1988 (21.01.88)

Claims 1-16, 17-25, 26-32

Documents 1 and 2 disclose surface plasmon resonance sensor chips that have an antibody against the measurement sample and a fixation layer for fixing said antibody.

Moreover, document 1 discloses the fact that amino coupling is used as the method for fixing the antibody, and the fact that on the surface of the sensor there is hydrogel (carboxydextran) layer, a streptoavidin layer, a metallic thin-film layer, and a hydrophobic surface.

Document 3 discloses an antibody against estrone, which is a sex hormone. Furthermore, document 4 discloses a dioxin measurement method that uses a monoclonal antibody. However, there are no disclosures whatsoever concerning applying these things to the surface plasmon resonance sensor chips of documents 1 and 2.

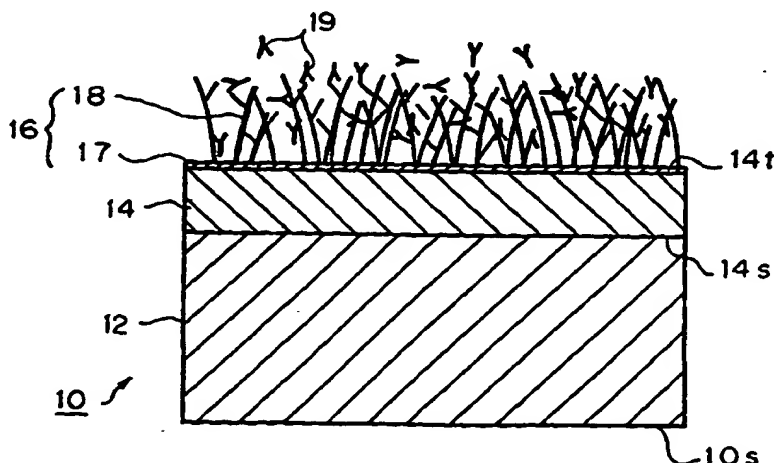




<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/543</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/42433</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月20日(20.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00066</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月12日(12.01.99)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 荏原製作所(EBARA CORPORATION)[JP/JP] 〒144-8510 東京都大田区羽田旭町11番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 輕部征夫(KARUBE, Isao)[JP/JP] 〒216-0002 神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16 Kanagawa, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>野村陽子(NOMURA, Yoko)[JP/JP] 〒207-0002 東京都東大和市湖畔2丁目325-10 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		

(54) Title: METHOD AND BIOSENSOR FOR DETECTING ANTIGEN

(54) 発明の名称 抗原の検出方法及びバイオセンサー



(57) Abstract

A sensor chip for surface plasmon resonance which has a thin metal film, an antibody against a substance with the steroid skeleton such as a steroid hormone, a sex hormone or an environmental hormone (excluding triazine compounds), and a fixation layer for fixing the antibody to the thin metal film; and a method for detecting an environmental hormone which involves the step of exposing the antibody in the above-mentioned sensor chip to a sample, the step of irradiating the thin metal film with light and the step of determining the intensity of the light reflected by the thin metal film. This method achieves a high sensitivity and an excellent selectivity.

(57)要約

金属薄膜と、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモン、性ホルモン、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）等に対する抗体と、前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップ。前記プラズモン共鳴用センサーチップの抗体をサンプルに曝露する工程と、前記金属薄膜に光を照射する工程と、前記金属薄膜からの反射光の強度を検出する工程と、を有する環境ホルモンの検出方法。高感度であり、かつ、選択性が優れている。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ			TR	トルコ
BY	ベラルーシ	CW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア				
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン				
DE	ドイツ	KP	北朝鮮				
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

抗原の検出方法及びバイオセンサー

5 発明の属する技術分野

本発明は、抗原の検出方法及びバイオセンサーに関し、特に、表面プラズモン共鳴を利用した抗原の検出方法及びバイオセンサーに関する。

関連技術

- 10 環境ホルモンとは、生物の内分泌機能に悪影響を及ぼす化学物質であり、環境中に放出された化学物質が、生物の体内に入ると、ホルモンと類似した働きをして本来のホルモン（例えば、甲状腺ホルモンや卵胞ホルモン）の働きを攪乱し、健全な生物およびその子孫の生殖機能や免疫機能などに悪影響を及ぼすものである。「環境ホルモン」は、内分泌攪乱化学物質、内分泌障害性化学物質
- 15 (Endocrine-Disrupting Chemicals Endocrine Disruptors)、ホルモン様化学物質と称されることもある。

- 環境庁、「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書」(1997)によると、環境ホルモンは、例えば、(a) 産業化学物質（合成洗剤、塗料、化粧品、プラスチック可塑剤等）、(b) ダイオキシン類、(c) 農薬（除草剤、
- 20 抗真菌、殺虫剤等）、(d) 医薬品（合成ホルモン）、(e) 天然物質に分類できる。

- 産業化学物質としては、例えば、ノニルフェノール、オクチルフェノールなどのアルキルフェノール類、ビスフェノールAなどのビフェノール類の一部、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチルなどのフタル酸誘導体が挙げられる。農
- 25 薬としては、例えば、DDT (DDD、DDE)、エンドサルファン、メトキシクロル、ヘプタクロル、トキサフェン、ディエルドリン、リンデン等が挙げられる。医薬品としては、ジエチルスティルベストロール (DES, diethylstilbestrol)、エチニルエストラジオール（経口避妊薬）等が挙げられる。天然物質としては、大豆、特に大豆に含まれ、植物性エストロジェンで

あるジェニスタインが挙げられる。

表 1 に環境ホルモンの分類の例示を示す。

表 1

物質カテゴリー	例	用途	報告されている作用
<天然物質>			
植物エストロゲン	イソフラボン類 リグナン類 クメスタン類	植物体内に存在	疑似エストロゲン作用 抗エストロゲン作用
女性ホルモン	17 β -エストラジオール エストロン	ヒトを含む動物体内 で自然に生成	疑似エストロゲン作用
<人工物質>			
ポリ塩化有機化合物	ダイオキシン類	焼却・化学工業の工 程で発生する意図し ない副生成物	抗エストロゲン作用
	PCB類	製造・使用中止 PCB含有施設をま だ使っている場合 (主に電気)がある	
有機塩素系農薬	DDT ディルドリン リンデン (γ -BHC)	殺虫剤 (禁止または 製造中止されたもの あり)	疑似エストロゲン作用 抗アンドロゲン作用
有機すず	トリブチルスズ	防汚剤	
アルキルフェノール	ノニルフェノール	ノニルフェノール・ エトキシレートと ポリマーの製造に使う	疑似エストロゲン作用
アルキルフェノール ・エトキシレート	ノニルフェノール・ エトキシレート	界面活性剤	疑似エストロゲン作用
フタル酸エステル類	ジブチル・フタレート (DBT) ブチルベンジル・フタレート (BBP)	プラスチック可塑剤	疑似エストロゲン作用
ビスフェノール化合物	ビスフェノールA	ポリカーボネートと エポキシ樹脂の成分	疑似エストロゲン作用
合成ステロイド	エチニル・エストラジオール	避妊薬	疑似エストロゲン作用

(環境庁、「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書」(1997)より引用)

環境ホルモンは、主に食物を通して生体内に摂取される。環境ホルモンの多くは、脂溶性が高く難分解性のため、食物連鎖を通して生体内に蓄積され易く、特に食物連鎖の上位にいる鳥類や海棲のほ乳類に高度に蓄積されている。環境ホルモンが生体に蓄積されると、ホルモンのバランスを崩し、発育、生育、免疫機能の異常や、乳がん、精巣がん等のがんの誘発、精子数の減少を引き起こすとされている。例えば、トリブチルスズにより海産巻貝の異変、フロリダにおける DDT によるワニ数の減少などが報告されている。

10 近年、最も注目されている環境ホルモンはダイオキシン類である。ダイオキシンはヒトの作り出した物質の中でもっとも毒性が高く、発ガン性もある。ダイオキシンの毒性が余りにも高いので、その摂取許容量は小さくなる。

例えば、日本国厚生省が1996年6月にダイオキシン類の耐容1日摂取量(TDI)として、10ピコグラム-TEQ kg⁻¹ day⁻¹を提案している。これに対して、
15 日本国環境庁は、1996年12月に健康リスク評価指針値として5ピコグラム-TEQ kg⁻¹ day⁻¹を設定している。表2に、各国が定めるダイオキシン類の摂取許容量をまとめる。

表 2

(1997年5月現在)

国名・機関(設定時期)	摂取許容量(pg/kg/day)	備 考
ドイツ(1985)	1～10	(予防レベル～緊急対策レベル)
スウェーデン(1988)	0～5	(1週当たり0～35)
デンマーク(1988)	0～5	(1週当たり0～35)
WHO 欧州事務局(1990)	10	
カナダ(1990)	10	
オランダ(1991)	10	
英国(1992)	10	
米国(1994)	0.01など	(EPA 等提案中)
オランダ(1996)	1	(国家保健審議会答申)
厚生省(1996)	10	

(環境庁ダイオキシンリスク評価研究会監修、「ダイオキシンのリスク評価」、中央法規、1997より引用)

このようにダイオキシン類の摂取許容量は極めて低いので、このような極微量のダイオキシン類を測定するのは困難である。また、ダイオキシン類には数多くの異性体があるので、その分析は更に難しくなる。さらに、ダイオキシン類を含むサンプルには、ダイオキシン類と構造の類似したジベンゾフラン類、P C B などが共存することも多く、これらの物質との分離も求められる。

従来、ダイオキシン類の測定には、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法が最も信頼のおける方法であるとされている。しかし、G C - M S では、極めて複雑な前処理を必要とし、例えば、前処理は2～3週間かかる。

図12に、排水試料の前処理のフローシートを示す。排水試料は適量をガラス繊維ろ紙(孔径 1 μ m)でろ過し、ろ液と固形分とに分ける。ろ液 1L に対してジクロロメタン 100 ml で2回抽出を行う。固形分はアセトンで脱水後トルエンで16時間以上ソックスレー抽出を行う。

それぞれの抽出液の混合したものに、内部標準 13C-2, 3, 7, 8-TCDD、13C-2, 3, 7, 8-TCDF、13C-2, 3, 7, 8-OCDD、13C-2, 3, 7, 8-OCDF を添加し濃縮器で 5 ml 程度に濃縮し、さらに窒素ガスを吹き付け可能な限りトルエンを留去し、硫酸処理の試料とする。なお、内部標準の添加は上記4種類の異性体以外の塩素置換体を含め、17種類の異性体の適正な範囲で可能な限り用い、回収補正を行うことが望ましい。このような前処理の後に、通常のG C - M S でダイオキシン類の測定を行う。

このように、G C - M S では、極めて複雑な前処理を必要とし、前処理に時間がかかった。また、前処理の段階で、作業者が環境ホルモンに曝露しないように、高度な安全対策が求められていた。

そこで、G C - M S に代わり、簡易、かつ、安全にダイオキシン類等の環境ホルモンを検出することが求められる。

また、公知の物質が未だ環境ホルモンと分かっていないこともあり得る。また、新規な物質が合成された場合には、その新規な物質が環境ホルモンである場合もありうる。

しかし、ある物質が生体内でホルモンと同様又は類似する働きをして内分泌を攪乱するか否かを調べることは容易ではない。

そこで、未だ環境ホルモンとして認識されていない物質を環境ホルモンか否かを簡易にスクリーニングすることが求められる。即ち、ある物質が環境ホルモンで

5 ある可能性を簡易にスクリーニングし、その後、スクリーニングを通った環境ホルモンの候補物質について、生体内で内分泌を攪乱するか否かを調べることが求められる。

なお、1998年6月3日～6月5日にドイツ、ベルリンの Inter-Continental Hotel で開催された“The Fifth World Congress on Biosensors”の要旨集には、

10 アトラジン抗体を固定したセンサーチップを用いて、表面プラズモン共鳴により、アトラジンを検出することが記載されている。しかし、この文献には、アトラジン以外の環境ホルモンに対する抗体については記載されていない。

1998年7月17日付けの、Satoshi Sasaki, Ryohei Nagata, Bertold Hock, Isao Karube, Analytica Chimica Acta 368(1998)71-76 には、アトラジン抗体

15 を固定したセンサーチップを用いて、表面プラズモン共鳴により、アトラジンを検出することが記載されている。しかし、この文献には、アトラジン以外の環境ホルモンに対する抗体については記載されていない。

発明の概要

20 本発明は、表面プラズモン共鳴を利用することにより、高感度に抗原を検出することができる。例えば、約0.1 ppbの感度に達する場合もある。また、抗原を定性的、定量的に検出することもできる。更に、従来のGC-MS法、酵素反応を用いる方法に比較し、操作が簡単である。また、本発明では、抗原、抗体反応を用いるので、選択性が優れている。

25 抗原が環境ホルモンの場合には、環境ホルモンを検出することができる。一方、抗原が、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進若しくは阻害する物質、又は、性ホルモンの生理作用を維持、促進若しくは阻害する物質が抗原の場合には、環境ホルモンのスクリーニングに有用である。

抗原が、ステロイドホルモン、性ホルモン等の場合には、医療用センサーとし

ても有用である。例えば、ステロイドホルモン、性ホルモンの分泌異常の検査（例えば、不妊検査）、妊娠検査、更年期障害検査、スポーツ選手等のドーピング検査などに応用することができる。

本発明の一側面では、金属薄膜と、ステロイド骨格を有する物質、ステロイド
5 ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、及び、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた1以上の抗原に対する1以上の抗体と、前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップが提供される。

10 本発明において、前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体であることが好ましい。あるいは、前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体であることが好ましい。

前記抗体が、エストロゲンに対する抗体であることが更に好ましい。あるいは、
15 前記抗体が、環式炭化水素部分を有する環境ホルモンに対する抗体であることが好ましく、前記抗体が、ダイオキシン類に対する抗体であることが更に好ましい。

また、前記抗体が、前記固定層に共有結合により固定されていることが好ましい。前記固定層が、1以上の有機薄膜層を含むことが好ましい。

前記有機薄膜層が、金属薄膜を被覆しているリンカー層を有することが好まし
20 い。あるいは、前記有機薄膜層が、ヒドロゲル層を有することが好ましい。あるいは、前記有機薄膜層が、ストレプトアビジン層を有することが好ましい。あるいは、前記有機薄膜層が、疎水性層を有することが好ましい。前記疎水性層が、金属薄膜と結合をするシリコン原子を含むことが好ましい。

前記金属薄膜は、入射光が照射される照射面と前記照射面の反対側の検出面と
25 を有し、前記固定層は前記金属薄膜の前記検出面に被覆していることが好ましい。前記金属薄膜の前記照射面が、照射光を透過させることができる基板を被覆していることが好ましい。2以上の前記抗原に対する2以上の前記抗体を有することが好ましい。

本発明の他の側面では、金属薄膜と、ステロイド骨格を有する物質、ステロイ

ドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、及び、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた 1 以上の抗原に対する 1 以上の抗体と、前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップの前記抗体をサンプルに曝露する工程と、前記金属薄膜に光を照射する工程と、前記金属薄膜からの反射光の強度を検出する工程と、を有する抗原の検出方法が提供される。

- 5 本発明において、前記反射光の消失角度の移動を求める工程を更に有することが好ましい。また、前記曝露工程の前に、標識物質と前記抗原とが結合した標識
- 10 抗原を前記抗体に結合させる工程を更に有することが好ましい。

前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体であることが好ましい。あるいは、前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体であることが好ましい。前記抗体が、エストロゲンに対する抗体であることが好ましい。

- 15 あるいは、前記抗体が、環式炭化水素部分を有する環境ホルモンに対する抗体であることが好ましい。前記抗体が、ダイオキシン類に対する抗体であることが好ましい。

前記表面プラズモン共鳴用センサーチップが 2 以上の前記抗原に対する 2 以上の前記抗体を有して、2 以上の抗原を検出することができることが好ましい。

- 20 本発明の他の側面では、金属薄膜と、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、及び、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた 1 以上の抗原に対する 1 以上の抗体と、前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、を有する表面プラズモン共鳴用センサー
- 25 チップと；

前記表面プラズモン共鳴用センサーチップに照射光を照射するための光源と、前記表面プラズモン共鳴用センサーチップからの反射光を検出するための検出器と、少なくとも照射光が透過するプリズムと、を有する光学系と；

前記表面プラズモン共鳴用センサーチップの前記抗体にサンプルを接触させる

ための流路系と；

を有する表面プラズモン共鳴装置が提供される。

本発明において、前記流路系が、フローセルを有していて、前記表面プラズモン共鳴用センサーチップが前記フローセルに対応した位置に配置されていることが好ましい。

図面の簡単な説明

図 1 A は、本発明の環境ホルモンの測定方法の概略説明図である。

図 1 B は、本発明の環境ホルモンの測定方法の概略説明図である。

10 図 2 A は、照射光の入射角、即ち、反射光の反射角と、反射光の強度との相関を示すグラフである。

図 2 B は、時間と共鳴シグナルとの相関を示すグラフである。

図 3 は、本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップの一実施態様の説明断面図である。

15 図 4 は、本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップの他の実施態様の説明断面図である。

図 5 A は、S P R 装置及び本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップの分解断面図である。

20 図 5 B は、S P R 装置及び本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップの断面説明図である。

図 6 A は、S P R 装置の流路系の説明図である。

図 6 B は、S P R 装置の流路系の拡大断面図である。

図 7 は、S P R 装置の流路系の拡大説明図である。

図 8 A、図 8 B 及び図 8 C は、競合法の説明図である。

25 図 9 は、競合法における、ダイオキシン濃度と応答値（R U）との相関を示す。

図 1 0 は、抗ダイオキシンモノクローナル抗体を固定後の時間と、応答値との相関を示す。

図 1 1 は、抗エストラジオールモノクローナル抗体を固定後の時間と、応答値との相関を示す。

図 1 2 は、従来の排水試料の前処理のフローシートである。

図 1 3 は、カップリング方法を示す。

図 1 4 は、カップリング方法を示す。

5 発明の好ましい実施の形態

本発明は、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したバイオセンサー及び抗原の検出方法に関する。表面プラズモン共鳴とは、金属薄膜に光を照射した場合に、照射表面と反対側の表面に光が伝播する現象をいう。表面プラズモン共鳴が発生する条件は一義的に定められる。

- 10 本発明では、スウェーデンの Pharmacia Biosensor 社（現 Biacore 社）が製造する ~~B I A C O R E~~（登録商標）という SPR 装置を好ましく用いることができる。日本では、この装置は、ピアコア株式会社（〒169-0073 東京都新宿区百人町3-25-1）から入手できる。

- 表面プラズモン共鳴を利用するバイオセンサー及び ~~B I A C O R E~~（登録商標）の測定原理及び測定方法については、橋本せつ子、「表面プラズモン共鳴現象を利用する生体分子相互作用の解析」、ぶんせき 1997（5）362～368、永田和宏、半田宏編「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法—~~B I A C O R E~~を中心に」、シュプリンガー・フェアラー東京株式会社、1998年、河田聡（1989）「表面プラズモンセンサー」0 plus E, 112, 133-139. に記載されている。これらの記載を本明細書に援用する。

- 図 1 A を参照しつつ、まず、表面プラズモン共鳴の原理を説明する。図 1 A で、センサーチップ 1 0 は金属薄膜を含み、センサーチップ 1 0 の一方の表面には所定の抗原に対する抗体 1 9 が固定されている。抗体 1 9 は、所定の抗原 2 9 を含有していてもよいサンプルが流れる流路 2 2 に曝露されている。サンプルは流体であり、典型的には、液体である。

図 3 は、センサーチップ 1 0 の説明断面図である。図 3 で、センサーチップ 1 0 は金属薄膜 1 4 を含み、金属薄膜 1 4 は、入射光が照射される照射面 1 4 s と照射面 1 4 s の反対側の検出面 1 4 t とを有する。言い換えれば、金属薄膜 1 4 は、抗体 1 9 が固定されている側の検出面 1 4 t とその反対側の照射面 1 4 s と

を有する。

図 1 Aで、センサーチップ 10 の表面 10 s 側にはプリズム 3 4 が配置されている。光源 3 2 が、プリズム 3 4 を通過しセンサーチップ 10 の金属薄膜 1 4 の照射面 1 4 s に光を照射する。光は偏光であることが好ましく、波長は 300 ~ 2000 nm であることが好ましい。一方、検出器 3 6 が、センサーチップ 10 の金属薄膜 1 4 の照射面 1 4 s から反射し、プリズム 3 4 を通過した反射光の強度をモニターする。照射光の入射角と反射光の反射角は当然、等しくなる。金属薄膜では、通常は、入射光の 9 割以上が反射し、残りが金属薄膜を透過する。

図 2 A は、照射光の入射角、即ち、反射光の反射角と、反射光の強度との相関を示す。入射角を代えながら光を照射していくと、曲線 40 の「光の谷」 42 に示されるように、反射光の強度が減衰する角度がある。この角度を反射光の消失角度又は SPR 角度という。この消失角度では、金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 t において表面プラズモン共鳴という量子力学的現象が起きている。より正確には、金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 t のみを伝搬する波（この波をエバネッセント波という。）が発生し、金属薄膜の自由電子の表面プラズモンを誘発している。照射光のエネルギーの一部が表面プラズモン共鳴のエネルギーに変換しており、これに伴って、反射光の強度が減衰している。

この消失角度は、金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 t、即ち、抗体 1 9 が固定されている側の金属薄膜 1 4 の表面 1 4 t の状態、例えば、所定の抗原 2 9 が抗体 1 9 に結合しているか異かに応じて変化する。そこで、本発明の方法の一実施態様では、この消失角度の移動を測定する。

図 1 A に示すように、流路 2 2 に、所定の抗原 2 9 を含むサンプルを流すと、図 1 B に示すように、所定の抗原 2 9 はセンサーチップ 10 の表面の抗体 1 9 と結合する。

本発明の方法の一実施態様では、図 2 A に示すように、消失角度の変化を測定する。本発明の方法の他の実施態様では、図 2 B に示すように、ある角度、典型的には消失角度における共鳴シグナルの経時変化を測定する。

図 2 A で、曲線 40 は所定の抗原 2 9 が抗体 1 9 に結合していない状態における、入射光の入射角と反射光の強度との相関を示す。一方、曲線 44 は所定の

抗原 2 9 が抗体に結合している状態における、入射光の入射角と反射光の強度との相関を示す。所定の抗原 2 9 が抗体 1 9 に結合することにより、「光の谷」 4 2 が「光の谷」 4 6 に移動していることが分かる。即ち、所定の抗原 2 9 が抗体 1 9 に結合することにより、消失角度が移動する。そして、消失角度の移動度は
5 抗体 1 9 と結合した所定の抗原の量、即ち、サンプル中の所定の抗原の量と相関関係がある。

「光の谷」の移動度を表す単位として、SPR 角度の 0.1 度の変化を 1000 レゾナンスユニット (RU) と定義する。放射性同位体で標識したタンパク質を用いて、SPR シグナルとセンサーチップ表面のタンパク質濃度の相関を観察
10 した実験により、1000 RU はセンサーチップ表面でのタンパク質の約 1 ng /mm² の質量変化に相当することが確認されている。この値はタンパク質の種類にかかわらずほぼ一定である。実際の測定においては約 10 RU (約 10 pg /mm²) 以上の変化を観察することができる。

図 2 B は、時間と「光の谷」 4 2、即ち、この消失角度における反射光の強度
15 との相関を示す。言い換えると、消失角度 4 2 における反射光の強度の経時変化を示す。所定の抗原 2 9 が抗体 1 9 に結合するにつれて、消失角度が変化していき、表面プラズモン共鳴が起きなくなることが分かる。センサーチップ 10 の表面における抗体 1 9 と所定の抗原 2 9 との相互作用をリアルタイムにモニターすることができる。

20 図 3 は、本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップの一実施態様を示す。米国特許第 5, 242, 828 号には、バイオセンサー用検出表面が記載されている。このバイオセンサー用検出表面は、本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップに好適に用いることができる。米国特許第 5, 242, 828 号の全ての開示は本明細書に援用される。

25 センサーチップ 10 は、光を透過させることができる基板 12 を有することが好ましい。基板 12 としては、典型的にはガラスが用いられる。基板として、光ファイバーの材料を用いても良い。例えば、0.2 ~ 0.8 mm の厚さのガラススライドを用いることができる。

センサーチップ 10 は、金属薄膜 14 を有する。表面プラズモン共鳴は、金属

薄膜 1 4 の照射面 1 4 s に所定の条件下で光が照射されることにより、金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 t に発生するからである。センサーチップ 1 0 を製造するときには、例えば、ガラス基板 1 2 上に金属薄膜 1 4 を蒸着、スパッタリング、無電解メッキ等により、形成する。蒸着の場合には、物理蒸着であってもよいし、化学蒸着であってもよい。

金属薄膜 1 4 は、1 層構造を有してもよいし、2 層構造等の多層構造を有してもよい。図 3 では、金属薄膜 1 4 は 1 層構造を有する。

金属薄膜 1 4 の厚さは、1 0 n m ~ 1 0 0 n m が好ましく、2 0 n m ~ 8 0 n m が更に好ましく、2 0 ~ 6 0 n m が更になお好ましい。1 0 0 n m より厚い場合には、表面プラズモン共鳴が起こり難くなる。一方、1 0 n m より薄い場合には、均一の厚さを形成することが困難になる。S P R シグナルの再現性を向上するためには、金属薄膜 1 4 の厚さは、均一であることが好ましい。

金属薄膜 1 4 は、金、銀、銅、アルミニウム、白金、イリジウム等からなることが好ましく、金、銀、白金等の貴金属からなることが好ましく、特に、照射面 1 4 s は貴金属からなることが好ましい。貴金属は化学的に不活性であり、かつ、S P R シグナルの発生効率が良いからである。貴金属の中でも、化学的安定性、S P R シグナルの発生効率のよさなどの観点から金が好ましい。

もともと、金属薄膜 1 4 は、8 0 重量%以上、好ましくは 9 0 重量%以上の貴金属と、2 0 重量%以下、好ましくは 1 0 重量%以下の他の金属とから構成されていてもよい。他の金属としては、例えば、アルミニウム等の典型金属、クロミウム等の遷移金属が挙げられる。

センサーチップ 1 0 は、抗体 1 9 を金属薄膜 1 4 に固定するための固定層 1 6 を有する。固定層 1 6 は、金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 t に形成されている。抗体 1 9 を直接、金属薄膜 1 4 に固定することは困難だからである。

固定層 1 6 は、2 層構造等の多層構造を有してもよいし、一層構造を有してもよい。図 3 では、固定層 1 6 はリンカー層 1 7 と固定本体 1 8 との 2 層構造を有する。リンカー層 1 7 は金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 t を被覆していることが好ましく、上述の米国特許第 5, 2 4 2, 8 2 8 号に記載されているように、金属薄膜 1 4 の検出面 1 4 s を腐食等から防止できることが好ましい。

一方、固定本体 18 は、抗体 19 を安定的に固定するものである。抗体 19 が固定本体 18 に共有結合により固定されていることが好ましい。また、固定本体 18 はリンカー層 17 に共有結合で結合することが好ましい。

リンカー層 17 としては、例えば、米国特許第 5, 242, 828 号に記載されているように、X-R-Y で示される有機分子の単一層であり、X は、ジスルフィド、スルフィド、セレニド、チオール、ニトリル、イソニトリル等である。

R は、例えば、酸素原子等のヘテロ原子で中断されていてもよい、炭素数が 12 ~ 30 の炭化水素基であり、例えば、アルキレン基である。

Y は、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、ヒドラジド基、カルボニル基、エポキシ基、ビニル基等の、抗体 19 と結合するための活性基である。

X-R-Y としては、例えば、16-メルカプトヘキサデカノールが用いられる。

固定本体 18 としては、米国特許第 5, 436, 161 号に記載されているように、ヒドロゲルを用いることができる。米国特許第 5, 436, 161 号の開示は本明細書に援用される。ヒドロゲルとしては多糖類、有機高分子を好ましく用いることができる。多糖類には、アガロース、デキストラン又はそれらのカルボキシメチル化誘導体が含まれる。有機高分子としては、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール等が挙げられる。

ヒドロゲルとしては、デキストラン又はカルボキシメチルデキストラン等のその誘導体が好き、特に、架橋構造をもたない単鎖のデキストラン又はカルボキシメチルデキストラン等のその誘導体が好き。デキストラン又はその誘導体を用いることにより、下記の利点がある。

① 汎用されている化学反応を用いて共有結合により抗体 19 を固定化することができる。

② 抗体 19 の結合容量を大きくすることができる。

③ 抗体 19 と所定の抗原 29 との相互作用に適したフレキシブルで、親水性のマトリックス環境を提供することができる。

④ センサーチップ表面への非特異的結合を低く抑えることができる。

S P Rシグナルの観察を容易にするため、固定本体 1 8の厚さは、金属薄膜 1 5の厚さの 1 倍～ 3 倍であることが好ましい。固定本体 1 8の厚さは、5 0～2 0 0 n mであることが好ましく、6 0～1 5 0 n mであることが更に好ましい。

5 固定本体の厚さは、S P Rシグナルの再現性のため、均一であることが好ましい。

図 4 は、本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップの他の実施態様を示す。同一の要素には同一の引用番号を付して、説明を省略する。図 4 のセンサーチップでは、金属薄膜 1 4 が 2 層構造を有する。クロミウム等の遷移金属薄膜 1 5 a が基板 1 2 上に形成され、その遷移金属薄膜 1 5 a 上に貴金属薄膜 1 5 b が形成
10 されている。遷移金属薄膜 1 5 a は、貴金属薄膜 1 5 b よりも薄いことが好ましく、遷移金属薄膜 1 5 a の厚さは金属薄膜 1 4 の厚さの 3 0 % 以下であることが好ましく、2 0 % 以下が更に好ましい。

図 4 では、固定層 1 6 が 2 層構造を有しておらず、1 層構造を有している。一実施態様では、 γ -アミノプロピルエトキシシラン、 $(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)$
15 $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})\text{SiH}_2$ 等の官能基を有する有機ケイ素化合物を用いることにより、ケイ素原子を介して金属薄膜 1 4 に安定的に結合することができる。また、有機ケイ素化合物のアミノ基をアルデヒドと反応させ、次いで、抗体 1 9 を導入することにより、固定層 1 6 と抗体 1 9 との間に共有結合を形成することができる。

前記固定層及び前記抗体が、式、 $\text{Si}-\text{L}-\text{Z}-\text{A}$ で示される部分、

20 (式中、L は、酸素原子等のヘテロ原子で中断されていてもよい、炭素数が 1 ～ 1 8 の炭化水素基であり、

A は、前記抗体であり、

Z は、前記固定層の活性基と前記抗体とがカップリングして生成した結合である。))

25 を有することが好ましい。

L が、式 $-(\text{CH}_2)_n-$ で示される基 (式中、n は 1 ～ 1 8 の整数であり、2 ～ 1 0 であることが好ましい。) ことが好ましい。

Z としては、例えば、チオール結合 $(-\text{S}-\text{S}-)$ 、酸アミド結合 $(-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-)$ 、ストレプトアビジン・ビオチン結合、式 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})\text{N}=\text{N}-$

C-で示される結合が挙げられる。

図4の他の実施態様では、固定層16は、チオールアルカン基であってもよい。これにより非常に疎水性の高い表面を形成することができ、また、生体膜に近い状態をセンサー表面に再現することができる。例えば、上述したリンカー層を厚く形成することにより、一層構造を有する固体層16を形成することができる。

固定層は3層構造を有していてもよい。例えば、図3に記載されている表面プラズモン共鳴用センサーチップの固定本体18の上にアミンカップリングにより、ストレプトアビジンを結合させ、ストレプトアビジン層を形成してもよい。例えば、固定層が、リンカー層17、ヒドロゲル層、そして、ストレプトアビジン層と、この順序に積層されて、形成されていてもよい。

ストレプトアビジンは分子量60,000の四量体構造をもつタンパク質である。ストレプトアビジン-ビオチンの結合の解離定数 10^{-15} Mであるので、ストレプトアビジン層は、ビオチン化された抗体を非常に安定に固定化することができる。

更に、図13及び図14に示すような公知のカップリング法を用いて、固定層中に種々の層を形成し、多層構造をデザインすることができる。

本発明のセンサーチップでは、所定の抗体19が固定層16に固定される。まず、所定の抗原について説明し、次いで、それに対する抗体19について説明する。

本発明では、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、又は、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）が抗原になる。ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、特に、ステロイドホルモンの生理作用を維持する物質の典型例は、ステロイドホルモンである。

同様に、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、特に、性ホルモンの生理作用を維持する物質の典型例は、性ホルモンである。

ある物質が、ステロイド骨格を有する物質であり、ステロイドホルモンであり、同時に、性ホルモンである場合もある。例えば、エストラジオール- 17β は、ステロイド骨格を有する物質であり、ステロイドホルモンであり、同時に、性ホ

ルモンである。また、ある物質が、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質であり、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質であり、同時に、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）である場合もある。本発明では、上記のカテゴリーの何れかに該当する物質を検出することを目的とする。

例えば、エストラジオール- 17β に対する抗体がセンサーチップに固定されている場合には、表面プラズモン共鳴により、試料中のエストラジオール- 17β を検出することができる。また、エストラジオール- 17β 以外の物質であっても、エストラジオール- 17β に対する抗体と結合することがある。そして、表面プラズモン共鳴により、ある物質がエストラジオール- 17β に対する抗体と結合したか否か検出することができる。

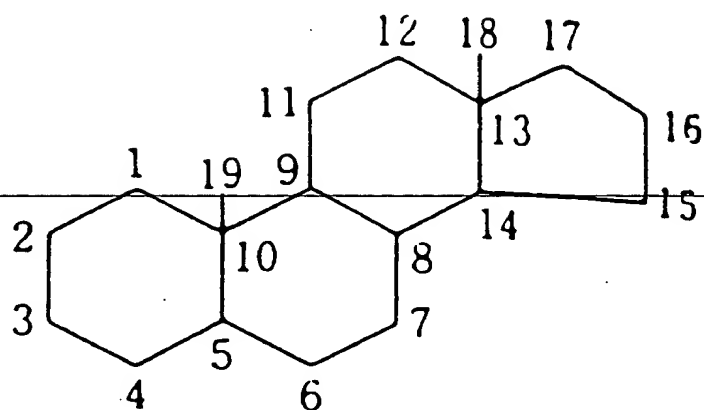
ここで、センサーチップ上のエストラジオール- 17β に対する抗体と結合する物質は、生体内においても、エストラジオール- 17β の受容体に結合し、内分泌を攪乱する可能性がある。即ち、このような物質は、エストラジオール- 17β に類似する生理作用を示す可能性があり、環境ホルモンに該当する可能性がある。そこで、ある物質が、エストラジオール- 17β に対する抗体と結合するか否かを検出することにより、その物質が環境ホルモンであるか否かのスクリーニングとなる。

環境ホルモンをスクリーニングするという原理は、エストラジオール- 17β に類似する生理作用を有する物質に対してのみではなく、その他のステロイドホルモン、性ホルモンに類似する生理作用を示す物質にも同様に適用することができる。

更に、ある物質がダイオキシン類に対する抗体に結合するということは、その物質が生体内においてダイオキシン類に類似する生理作用を示す可能性があるということである。

これらのことを考慮すると、スクリーニングをするという原理は、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、並びに、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質に対しても同様に適用することができる。以下、抗原について更に詳しく説明する。

ステロイドは、ステロイド骨格、すなわち、シクロペントノペルヒドロフェナントレン炭素骨格を有する化合物群の総称である。ステロイド骨格の構造を下記に示す。



ステロイドの基本骨格

ステロイドには、ステロール、胆汁酸、性ホルモン、副腎皮質ホルモン等が含まれる。なお、性ホルモンはステロイドであることが多いが、発情ホルモンのように非ステロイド系ホルモンもある。

- 5 C_{18} ステロイドとしては、例えば、エストロゲンが挙げられる。 C_{19} ステロイドとしては、例えば、アンドロゲンが挙げられる。 C_{21} ステロイドとしては、例えば、ゲスターゲン、副腎皮質ホルモンが挙げられる。 C_{24} ステロイドとしては、例えば、胆汁酸が挙げられる。

- 10 副腎皮質ホルモンは、グルココルチコイドとミネラルコルチコイドに大別される。グルココルチコイドには、コルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン等が含まれる。ミネラルコルチコイドには、アルドステロン、 $11\text{-}\beta$ -デオキシコルチコステロン、 $11\text{-}\beta$ -デオキシコルチゾールが含まれる。

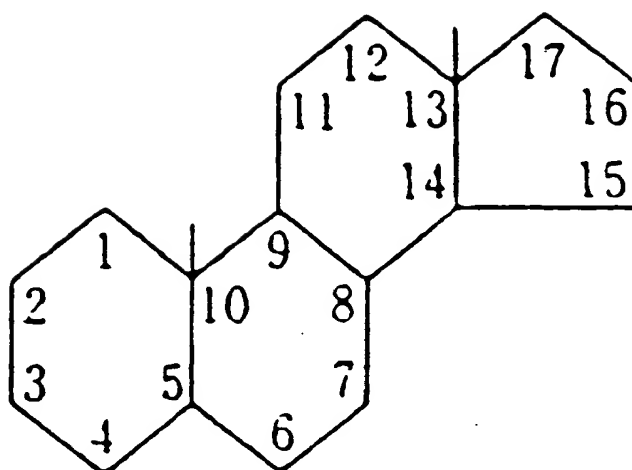
- 15 哺乳類など高等脊椎動物の胆汁酸の多くは、コラン酸のヒドロキシ誘導体であり、ヒトの胆汁にはコール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、リトコール酸などが含まれる。動物の種によっては、胆汁酸の種類、組成に若干の違いがある。

ステロイド骨格を有する物質には、テトロドトキシンも含まれる。テトロドトキシンは猛毒なので、極微量のテトロドトキシンを簡易に検出することは有意義である。

- 20 ステロイドホルモンとは、ステロイドであるホルモンをいい、例えば、エストロゲン、アンドロゲン、ゲスターゲン、副腎皮質ホルモンなどが挙げられる。

性ホルモンは、主として生殖腺から分泌され、生殖器系の成長、発達を誘発、促進させ、二次性徴の発現や生殖行動の誘起をも行うホルモンの総称である。性ホルモンには、アンドロゲン、エストロゲン及びゲスターゲンが含まれる。

- 25 アンドロゲンは、一般には、雄性ホルモン作用をもつステロイドホルモンの総称である。しかし、本明細書では、アンドロゲンは炭素19個からなるアンドロスタン骨格を有するステロイドをいう。アンドロスタン骨格を下記式に示す。



アンドロスタン骨格

アンドロゲンには、テストステロン、アンドロステンジオン、デヒドロエピアンドロステロンが含まれる。

- アンドロゲンの生理作用としては、胎生期の性分化、雄性生殖器官（輸精管・前立腺・精嚢・精巣上体・外部生殖器）の機能維持、二次性徴の発現、精子形成の促進、骨格筋などにおけるタンパク質同化作用の促進などが挙げられ、更に、視床下部や下垂体に働いて負のフィードバック機構により黄体形成ホルモンの分泌を抑制することも挙げられる。

- 例えば、テストステロンは、下記のような生理作用を示す。テストステロンは、二次性徴の発現、蛋白質同化作用、筋肉の発育促進などの機能を持つ。また、下垂体に働いて、生殖腺刺激ホルモンの分泌を抑制し、血中のテストステロン濃度はフィードバック機構により一定に維持するという生理作用も示す。

エストロゲンとは、脊椎動物において主として卵巣から分泌され、雌の生殖腺付属器官を発育させてその機能を営ませる性ホルモンの一種である。哺乳類では発情状態を誘起する。胎盤からも分泌され、そのほか副腎皮質や精巣からも少量

分泌される。エストロゲンには、発情ホルモン及び黄体ホルモンが含まれる。エストロゲンとしては、エストラジオール- 17β 、エストロン、エストリオールが主なものである。

エストロゲンを大別すると、1) 卵巣の成熟した卵胞および妊娠した場合胎盤
5 で合成・分泌されるエストラジオール、尿などに多く見いだされるエストロン、エストリオール、エキリン、エキレニンなどのステロイドホルモンとその代謝物、2) これらのホルモンの化学的誘導体で発情作用をもつもの（例：ホモエストロン、エチニルエストラジオール、ドワジノール酸）、3) ステロイド構造をもたないが、発情作用を示す合成物質、すなわち合成エストロゲン（synthetic
10 estrogen）（例：ジエチルスチルベストロール、ヘキセストロール）がある。

例えば、エストラジオール- 17β は、下記の生理作用を示す。哺乳類では卵
胞や乳腺の発育を促進し、付属性腺に働いて二次性徴を促す。また、脳弓状核に
作用して、黄体形成ホルモン（LH）に対し負のフィードバックを誘導するが、
視床前野においては正に作用して生殖線刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）
15 を分泌させ、また下垂体のGnRHに対する感受性を高めて、排卵前のLHサー
ジを起こす。鳥類では、輸卵管において卵白蛋白質の合成・分泌を促進する。卵
生脊椎動物においては、エストラジオール- 17β は肝臓に作用して卵黄蛋白質
前駆体のビテロジュニンは血流により卵巣に運ばれ、卵に取り込まれて卵黄蛋白
質となる。

20 ゲスターゲン(gestagen)は、哺乳類において受精卵の着床、妊娠維持作用など
のプロゲステロン様作用をもつ化合物の総称である。ゲスターゲンをプロゲステ
ン、プロゲストーゲンともいう。ゲスターゲンの典型例は、プロゲステロンであ
るが、 20β -ジヒドロキシプロゲステロン、プレグナジオールなど上記の活
性をもたないプロゲステロン類似ステロイドもゲスターゲンに含まれる。ゲスタ
25 ーゲンは、黄体ホルモンの作用を受けた黄体から分泌される。

ゲスターゲンの生理作用としては、エストロゲンと協働的に働いて、子宮内膜
の肥厚と子宮腺の分岐を起こすことにより、受精卵の着床を促すこと挙げられ、
さらにエストロゲンと拮抗的に作用して発情を抑え、妊娠を継続させることも挙
げられる。

ゲスターゲンは哺乳黄体からも分泌され、また種によっては妊娠中に多量に分泌される。ゲスターゲンはエストロゲンと協働的に下垂体前葉に作用して黄体形成ホルモンの分泌を抑えるため、黄体の活動中は排卵が起こらない。

環境ホルモンは、上述したように、生物の内分泌機能に悪影響を及ぼす化学物質であり、環境中に放出された化学物質が、生物の体内に入ると、ホルモンと類似した働きをして本来のホルモン（例えば、甲状腺ホルモンや卵胞ホルモン）の働きを攪乱し、健全な生物およびその子孫の生殖機能や免疫機能などに悪影響を及ぼすものである。

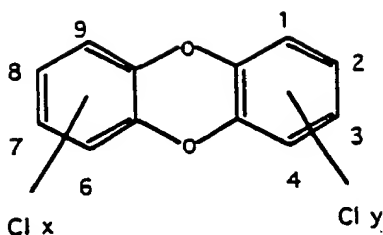
環境ホルモンとしては、例えば、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール類（PCB）、ポリ臭化ビフェニール類（PCB）、ヘキサクロロベンゼン（HCB）、ペンタクロロフェノール（PCP）、2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、アミトロール、アトラジン、アラクロール、シマジン、ヘキサクロロシクロヘキサン、エチルパラチオン、カルバリン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、1, 2-ジブromo-3-クロロプロパン、DDT、DDE、DDD、ケルセン、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、エンドスルファン（ベンゾエピン）、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシイド、マラチオン、メソミル、メトキシクロル、マイレックス、ニトロフェン、トキサフェン、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、トリフルラリン、アルキルフェノール（C4からC9）、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ベンゾ（a）ピレン、2, 4-ジクロロフェノール、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、オクタクロロスチレン、アルディカーブ、ベノミル、キーボン（クロルデコン）、マンゼブ（マンコゼブ）、マンネブ、メチラム、メトリブジン、シペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ピンクロゾリン、ジネブ、ジラム、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジブピル、スチレンの2及び3量体、スチレン、n-ブチルベンゼン、エストラジオールなどが挙げられる。これらの環境ホルモン中、トリアジン系化合物としては、アトラジン、シマジンが挙げられる。

環式炭化水素部分を有する環境ホルモンには、毒性が高いものがある。環式炭化水素部分は、芳香族の場合もあれば、脂肪族の場合もある。環式芳香族炭化水素部分としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、フェナントレン環、アントラセン環、ピレン環等が挙げられる。例えば、インデン、フェノール、スチレン等はベンゼン環という芳香族環式炭化水素部分を有する。環式炭化水素部分は縮合環の基礎成分の場合もある。

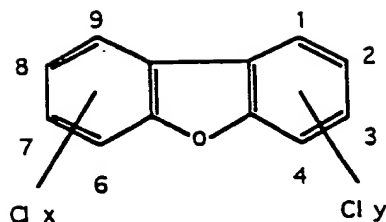
環式炭化水素部分を有する環境ホルモンとしては、例えば、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール類（PCB）、ポリ臭化ビフェニール類（PCB）、ヘキサクロロベンゼン（HCB）、ペンタクロロフェノール（PCP）、2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、トリフェニルスズ、アルキルフェノール（C4からC9）、ビスフェノールA、フタル酸アルキルエステル類、ベンゾ（a）ピレン、2, 4-ジクロロフェノール、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、オクタクロロスチレン、スチレンの2及び3量体、スチレン、n-ブチルベンゼン、エストラジオールなどが挙げられる。

ハロゲン原子で置換された環式炭化水素部分、特にハロゲン原子で置換された環式芳香族炭化水素部分を有している環境ホルモンの中には、特に毒性が高いものが含まれる。ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子又はこれらの任意の組み合わせをいい、特に、塩素原子及び臭素原子が問題となる。ハロゲン原子で置換された環式炭化水素部分を有している環境ホルモンとしては、例えば、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール類（PCB）、ポリ臭化ビフェニール類（PCB）、ヘキサクロロベンゼン（HCB）、ペンタクロロフェノール（PCP）、2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、2, 4-ジクロロフェノールなどが挙げられる。

ダイオキシン類とは、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン（Polychlorodibenzoparadioxine、以下、PCDDという。）とポリ塩化ジベンゾフラン（Polychlorodibenzofuran、以下、PCDFという。）の総称である。構造式を下記に示す。



(a) PCDDs (ポリ塩化ジベンソパラジオキシン)



(b) PCDFs (ポリ塩化ジベンソフラン)

PCDD、PCDFともに2つのベンゼン環を含む縮合環であり、これらの1から9の炭素位に塩素が1～8個結合することから、PCDDでは75種類の、PCDFでは135種類の異性体が存在する。

これらの異性体のなかで、2, 3, 7, 8-PCDDがもっとも毒性の高いことがわかっている。2, 3, 7, 8-PCDD (分子量 321.9) は融点が300度付近にあり常温では安定な物質であり、耐酸性、耐アルカリ性である。一方で、紫外線により分解しやすく、この性質はPCDD、PCDFの廃棄処理に使われる。

ダイオキシン類は、水には溶解しづらいが ($2 \times 10^{-7} \text{ g L}^{-1}$)、極性の近い *o*-ジクロロベンゼン (1.8 g L^{-1}) には特に溶解しやすい。そのほか、メタノール、クロロホルム、ノナン、トルエンなどには溶解する。最大吸収スペクトルはクロロホルム溶解時に310 nmである。このようなダイオキシン類が脂溶性であるという性質は、生体にダイオキシンが取り込まれた場合の体内蓄積分布にも影響を与える。

ダイオキシン類の各々の異性体の毒性については、受容体との結合能、アリルヒドロカーボン水酸化酵素誘導能、毒性影響を考慮して、2, 3, 7, 8-TC

DDの毒性を基準とした力価換算して表示している。

表 3

塩素数	化合物名	TEF	化合物名	TEF
4	Tetra CDD		Tetra CDF	
	2,3,7,8-	1	2,3,7,8-	0.1
	1,3,6,8-	0	1,3,6,8-	0
	1,3,7,9-	0	その他	0
	その他	0		
5	Penta CDD		Penta CDF	
	1,2,3,7,8-	0.5	1,2,3,7,8-	0.05
	その他	0	2,3,4,7,8-	0.5
			その他	0
6	Hexa CDD		Hexa CDF	
	1,2,3,4,7,8-	0.1	1,2,3,4,7,8-	0.1
	1,2,3,6,7,8-	0.1	1,2,3,6,7,8-	0.1
	1,2,3,7,8,9-	0.1	1,2,3,7,8,9-	0.1
	その他	0	2,3,4,6,7,8-	0.1
			その他	0
7	Hepta CDD		Hepta CDF	
	1,2,3,4,6,7,8-	0.01	1,2,3,4,6,7,8-	0.01
	その他	0	1,2,3,4,7,8,9-	0.01
8	Octa CDD		Octa CDF	
		0.001		0.001

次に、これらの抗原に対する抗体について説明する。抗体は、商業的に入手できるものもあれば、実験的に作成することもできる。

抗アンドロゲン抗体、抗エストロゲン抗体、抗ゲスターゲン抗体、抗コルチコ抗ステロイド抗体、抗胆汁酸抗体については、例えば、下記に列記する抗体をコスモバイオ株式会社（〒135-0016 日本国東京都江東区東陽2-2-20）から、入手することができる。

抗アンドロゲン抗体としては、例えば、抗テストステロン抗体、抗アンドロステンジオン抗体、抗デヒドロエピアンドロステロン抗体、抗ジヒドロテストステロン抗体、抗19-OH-テストステロン抗体、抗19-OH-アンドロステンジオン抗体、抗11-オキソーテストステロン抗体、抗19-ノル-テストステロン抗体、抗19-ノル-4-アンドロステンジオン抗体、抗16 α -OH-4-アンドロステンジオン抗体、16 α -OH-デヒドロエピアンドロステロン抗体、抗16 α -OH-デヒドロアンドロステロン抗体、抗16 α -OH-テストステロン抗体、抗5 α -アンドロスタン-3 α , 17 β -ジオール抗体、抗テストステロン-グルクロニド抗体、抗アンドロステンジオン抗体、抗11 β -OH-アンドロステンジオン抗体、抗5 α -アンドロスタン-3 α , 17 β -ジオール-3-グルクロニド抗体、抗5 α -アンドロスタン-3 α , 17 β -ジオール-17-グルクロニド抗体が挙げられる。

抗エストロゲン抗体としては、例えば、抗エストロン抗体、抗エストラジオール抗体、抗エストリオール抗体、抗エストテロール抗体、抗16 α -OH-エストロン抗体、抗2-OH-エストロン抗体、抗4-OH-エストロン抗体、抗2-メトキシエストロン抗体、抗4-メトキシエストロン抗体、抗エチニルエストラジオール抗体、抗エストロン-3-グルクロニド抗体、抗エストロン-3-サルフェート抗体、抗エキレニン抗体、抗エキリン抗体、抗ジエチルスチルベストロール抗体、抗エストロン-3抗体が挙げられる。

抗ゲスターゲン抗体としては、例えば、抗プロゲステロン抗体、抗16 α -OH-プロゲステロン抗体、抗17 α -OH-プロゲステロン抗体、抗20 α -OH-プロゲステロン抗体、抗20 β -OH-プロゲステロン抗体、抗プレグネノ

ロン抗体、抗プレグネノロン-3抗体、 16α -OH-プレグネノロン抗体、 17α -OH-プレグネノロン抗体、抗 5α -プレグナン-3-20-ジオン抗体、
 5 抗 17α -OH-プレグネノロン-3-サルフェート抗体、抗 $17, 20\alpha$ -diOHプロゲステロン抗体、抗 $17\alpha, 20\beta$ -diOHプロゲステロン抗体、
 抗プレグナンジオール-3-グルクロニド抗体、抗プレグナンジオール-3-CMO抗体、抗プレグナントリオール-3-グルクロニド抗体、抗 $17\alpha, 20\beta, 21$ -triOH-プロゲステロン抗体が挙げられる。

抗コルチコステロイド抗体としては、抗コルチゾール抗体、抗コルチゾン抗体、
 抗デオキシコルチゾン抗体、抗コルチコステロン抗体、抗デオキシコルチコステ
 10 ロン抗体、抗 18 -OH-コルチコステロン抗体、抗 18 -OH-デオキシコルチコステロン抗体、
 抗アルドステロン抗体、抗 11 -デヒドロコルチコステロン抗体、抗 6β -OH-コルチゾール抗体、
 抗THF（テトラヒドロコルチゾール）抗体、抗THE（テトラヒドロコルチゾン）抗体、
 抗THS（テトラヒドロデオキシコルチゾン）抗体、抗テトラヒドロアルドステロン抗体、
 15 抗コルトール抗体、抗 11 -デオキシコルトール抗体が挙げられる。

抗胆汁酸抗体としては、例えば、抗コール酸抗体、抗グリココール酸抗体、
 抗デオキシコール酸抗体、抗グリコデオキシコール酸抗体、抗ケノデオキシコール
 酸抗体、抗グリコケノデオキシコール酸抗体、抗リトコール酸抗体、抗グリコリ
 トコール酸抗体、抗リトコール酸サルフェート抗体、抗グリコリトコール酸サル
 20 フェート抗体、抗ケノデオキシコール酸サルフェート抗体、抗ウルソデオキシコ
 ール酸抗体、抗ヒオデオキシコール酸抗体が挙げられる。

また、抗成長ホルモンポリクローナル抗体は、コスモバイオ株式会社から入手
 することができる。なお、成長ホルモンは、ステロイドホルモンの1種である。

環境ホルモンに対する抗体で、商業的に入手できるものを下記に例示する。
 25 ヘプタクロール抗体は、バイオストライド社及びケミコン社から入手できる。抗
 マラチオン抗体、抗パラチオン抗体は、ケミコン社から入手できる。抗PCB抗
 体は、コンセプト社から入手できる。

抗ダイオキシン類抗体の作製方法は、例えば、L. H. Stanker, B. Watkins, N. Rogers、及びM. Vanderlaan、“抗ダイ

オキシモノクローナル抗体：抗体のキャラクタリゼーション及びアッセイ開発” *Toxicology*, 45 (1987) 229-243に記載されている。

また、下記に説明するように、抗原ハプテンと高分子化合物との結合体を作製し、次いで、ポリクローナル抗体を作製することができる。所望により、下記に

5 説明するように、ポリクローナル抗体からモノクローナル抗体を作製することができる。

抗原ハプテンと高分子化合物との結合体の作製

抗原の分子量が小さい場合には、抗原ハプテンを適当な高分子化合物に結合させてから免疫用抗原として使用することが好ましい。

10

好ましい高分子化合物の例としては、スカシガイヘモシアニン（以下、「KLH」と言う）、卵白アルブミン（以下、「OVA」と言う）、ウシ血清アルブミン（以下、「BSA」と言う）、ウサギ血清アルブミン（以下、「RSA」と言う）などがある。

15 抗原ハプテンと高分子化合物との結合は、例えば、活性化エステル法（A. E. KARU et al. : *J. Agric. Food Chem.* 42 301-309 (1994)）、又は混合酸無水物法（B. F. Erlanger et al. : *J. Biol. Chem.* 234 1090-1094 (1954)）等の公知の方法によって行うことができる。

20 活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、ハプテン化合物を有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にてN-ヒドロキシこはく酸イミドと反応させ、N-ヒドロキシこはく酸イミド活性化エステルを生成させる。

カップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が含まれる。有機溶媒としては、例えば、ジメチルスルホキシド（以下、「DMSO」と言う）、N, N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジオキサン等が使用できる。反応に使用するハプテン化合物とN-ヒドロキシこはく酸イミドのモル比は好ましくは1 : 10から10 : 1、より好まし

25

くは1 : 1から1 : 10、最も好ましくは1 : 1である。反応温度は、0℃から100℃、好ましくは5℃から50℃、より好ましくは22℃から27℃で、反応時間は5分から24時間、好ましくは30分から6時間、より好ましくは1時間から4時間である。反応温度は各々の融点以上沸点以下の温度で行うことができる。

カップリング反応後、反応液を高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基とハプテン化合物のカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0℃から60℃、好ましくは5℃から40℃、より好ましくは22℃から27℃で、
10 反応時間は5分から24時間、好ましくは1時間から16時間、より好ましくは1時間から2時間である。反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製して、抗原ハプテンと高分子化合物との結合体を得ることができる。

一方、混合酸無水物法において用いられる混合酸無水物は、カルボン酸とハロゲン蟻酸エステルとの反応により得られ、これを高分子化合物と反応させること
15 により目的とするハプテン-高分子化合物結合体が製造される。この反応は塩基性化合物の存在下に行われる。塩基性化合物としては、例えば、トリブチルアミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、N-メチルホルマリン、ピリジン、N,N-ジメチルアニリン、DBN、DBU、DABCO等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基
20 等が挙げられる。該反応は、通常マイナス20℃から100℃、好ましくは0℃から50℃において行われ、反応時間は5分から10時間、好ましくは5分から2時間である。得られた混合酸無水物と高分子化合物との反応は、通常マイナス20℃から150℃、好ましくは0℃から100℃において行われ、反応時間は5分から10時間、好ましくは5分から5時間である。混合酸無水物法は一般に
25 溶媒中で行われる。溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も使用可能であり、具体的にはジオキサン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N,N-ジメチルホ

ルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。混合酸無水物法において使用されるハロ蟻酸エステルとしては、例えばクロロ蟻酸メチル、ブromo蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、ブromo蟻酸エチル、クロロ蟻酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるハプテンとハロ蟻酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質を抗原ハプテンに結合させたものを、抗原の検出において使用することができる。標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ（以下「HRP」と言う）、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{125}I 等の放射性物質、化学発光物質などがある。

ポリクローナル抗体の作製

抗原ハプテンと高分子化合物との結合体を使用して、慣用化された方法によりポリクローナル抗体を作製することができる。例えば、抗原ハプテン-BSA結合体をリン酸ナトリウム緩衝液（以下、「PBS」と言う）に溶解し、フロイント完全アジュバント又は不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤と混合したものを、免疫用抗原として動物に免疫することによって得ることができる。免疫される動物としては当該分野で常用されるものをいずれも使用できるが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等を挙げることができる。

免疫の際の投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射又は腹腔内注射が好ましい。免疫は1回又は適当な間隔で、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。

免疫した動物から血液を採取し、そこから分離した血清を用い、抗原と反応するポリクローナル抗体の存在を評価することができる。

抗原ハプテンと高分子化合物との結合体を免疫用抗原として得られた抗血清は、間接競合阻害ELISA法において、例えば、約 10 ng/ml の濃度で抗原と反応できる。

モノクローナル抗体の作製

抗原ハプテンと高分子化合物との結合体を使用して、公知の方法によりモノクローナル抗体を作製することができる。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、少なくとも下記のような作業工程が必要である。

- (a) 免疫用抗原として使用する抗原ハプテンと高分子化合物との結合体の作製
- (b) 動物への免疫
- (c) 血液の採取、アッセイ、及び抗体産生細胞の調製
- (d) ミエローマ細胞の調製

10 (e) 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合とハイブリドーマの選択的培養

(f) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングと細胞クローニング

15 (g) ハイブリドーマの培養又は動物へのハイブリドーマの移植によるモノクローナル抗体の調製

- (h) 調製されたモノクローナル抗体の反応性の測定等

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するための常法は、例えば、ハイブリドーマ テクニックス (Hybridoma Techniques), コールド スプリング ハーバー ラボラトリーズ (Cold Spring Harbor Laboratory, 1980 年版)、細胞組織化学 (山下修二ら、日本組織細胞化学会編; 学際企画、1986 年) に記載されている。

以下、抗原に対するモノクローナル抗体の作製方法を説明するが、これに制限されないことは当業者によって明らかであろう。

25 (a) - (b) の工程は、ポリクローナル抗体に関して記述した方法とほぼ同様の方法によって行うことができる。

(c) の工程における抗体産生細胞はリンパ球であり、これは一般には脾臓、胸腺、リンパ節、末梢血液又はこれらの組み合わせから得ることができるが脾細胞が最も一般的に用いられる。従って、最終免疫後、抗体産生が確認されたマウスより抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、脾細胞を調製する。

(d) の工程に用いることのできるミエローマ細胞としては、例えば、B a l b/c マウス由来骨髓腫細胞株の P 3 / X 6 3 - A g 8 (X 6 3) (N a t u r e, 2 5 6, 4 9 5 - 4 9 7 (1 9 7 5))、P 3 / X 6 3 - A g 8. U 1 (P 3 U 1) (C u r r e n t T o p i c s. i n M i c r o b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y, 8 1, 1 - 7 (1 9 8 7))、P 3 / N S 1 - 1 - A g 4 - 1 (N S - 1) (E u r. J. I m m u n o l., 6, 5 1 1 - 5 1 9 (1 9 7 6))、S p 2 / O - A g 1 4 (S p 2 / O) (N a t u r e, 2 7 6, 2 6 9 - 2 7 0 (1 9 7 8))、F O (J. I m m u n o. M e t h., 3 5, 1 - 2 1 (1 9 8 0))、M P C - 1 1、X 6 3. 6 5 3、S 1 9 4 等の
10 骨髓腫株化細胞、あるいはラット由来の 2 1 0. R C Y 3. A g 1. 2. 3. (Y 3) (N a t u r e, 2 7 7, 1 3 1 - 1 3 3, (1 9 7 9)) 等を使用できる。

上述した株化細胞をウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 又はイスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M) で継代培養し、融合当日に約
15 1×10^6 以上の細胞数を確保する。

(e) の工程の細胞融合は公知の方法、例えばミルスタイン (M i l s t e i n) らの方法 (M e t h o d s i n E n z y m o l o g y, 7 3, 3 (1 9 8 1)) 等に準じて行うことができる。現在最も一般的に行われているのはポリエチレングリコール (P E G) を用いる方法である。P E G 法については、例えば、
20 細胞組織化学、山下修二ら (上述) に記載されている。別の融合方法としては、電気処理 (電気融合) による方法を採用することもできる (大河内悦子ら、実験医学 5. 1 3 1 5 - 1 9, 1 9 8 7)。その他の方法を適宜採用することもできる。また、細胞の使用比率も公知の方法と同様でよく、例えばミエローマ細胞に対して脾細胞を 3 倍から 1 0 倍程度用いればよい。

25 脾細胞とミエローマ細胞とが融合し、抗体分泌能及び増殖能を獲得したハイブリドーマ群の選択は、例えば、ミエローマ細胞株としてヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株を使用した場合、例えば上述の D M E M や I M D M にヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを添加して調製した H A T 培地の使用により行うことができる。

(f) の工程では、選択されたハイブリドーマ群を含む培養上清の一部をとり、例えば後述する E L I S A 法により、抗原に対する抗体活性を測定する。

さらに、測定により抗原に反応する抗体を産生することが判明したハイブリドーマの細胞クローニングを行う。この細胞クローニング法としては、限界希釈により 1 ウェルに 1 個のハイブリドーマが含まれるように希釈する方法「限界希釈法」；軟寒天培地上に撒きコロニーをとる方法；マイクロマニピュレーターによって 1 個の細胞を取り出す方法；セルソーターによって 1 個の細胞を分離する「ソータークローン法」等が挙げられる。限界希釈法が簡単であり、よく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によりクローニングを 1 - 4 回繰り返して安定して抗体価の得られたものを、抗抗原モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。ハイブリドーマを培養する培地としては、例えば、ウシ胎児血清 (F C S) を含む D M E M 又は I M D M 等が用いられる。ハイブリドーマの培養は、例えば二酸化炭素濃度 5 - 7 % 程度及び 3 7 °C (1 0 0 % 湿度の恒温器中) で培養するのが好ましい。

(g) の工程で抗体を調製するための大量培養は、フォローファイバー型の培養装置等によって行われる。又は、同系統のマウス (例えば、上述の B a l b / c) あるいは N u / N u マウスの腹腔内でハイブリドーマを増殖させ、腹水液より抗体を調製することも可能である。

これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗抗原モノクローナル抗体として使用することができるが、さらに透析、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲル濾過、凍結乾燥等を行い、抗体画分を集め精製することにより抗抗原モノクローナル抗体を得ることができる。さらに、精製が必要な場合には、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) などの慣用されている方法を組み合わせることにより実施できる。

以上のようにして得られた抗原に対するモノクローナル抗体は、例えば E L I S A 法などの公知の方法を使用して、サブクラス、抗体価等を決定することができる。

図 3 及び図 4 で、抗体 1 9 は、公知の方法によって、固定層 1 6 と共有結合を

形成することができる。例えば、上述した、活性化エステル法（A. E. KAR
U et al. : J. Agric. Food Chem. 42 301-309 (1994)）、
又は混合酸無水物法（B. F. Erlanger et al. : J. Biol.
Chem. 234 1090-1094 (1954)）、及びその他の公知のカップリング方法を
5 用いることができる。

公知のカップリング方法を図13及び図14に示す。図13及び図14のカッ
プリング方法は、V. P. Torchilin: Adv. Drug Deliv
ir y Rev., 1, 41 (1987)、及び、社団法人日本化学会編「第4
版 実験化学講座29 高分子材料」、丸善株式会社 平成5年9月25日発行
10 に詳細に記載されている。

典型的には、抗体19が固定されていないセンサーチップを、BIA CORE
（登録商標）社から入手可能なSPR装置に挿入できる所定のホルダーの所定の
位置に埋め込み、次いで、そのホルダーをSPR装置に挿入し、所定の反応液を
SPR装置に流入させることにより、センサーチップ表面に抗体19を固定する。

15 図5A及び図5Bは、SPR装置、特にそのフローセル構造体及び本発明の表
面プラズモン共鳴用センサーチップを示す。図5Aでは、説明の便宜上、プリズ
ム34、光学インターフェース38等の光学系と、センサーチップ10と、セル
構造体42等のマイクロ流路系とを分離して示している。これに対して、図5B
は、光学系、センサーチップ10と、マイクロ流路系の断面図である。

20 図5A及び図5Bで、10が本発明の表面プラズモン共鳴用センサーチップを
示す。例えば、図3及び図4に示す表面プラズモン共鳴用センサーチップである。
典型的には、センサーチップ10はホルダー内に形成されており、ホルダーをS
PR装置に挿入することにより、センサーチップ10が光学系とマイクロ流路系
との間に、固定される。このホルダーは、SPR装置から取り出すこともできる。

25 センサーチップ10の一方の側には、マイクロ流路系が配置され、他方の側
には、光学系が配置されている。

光学系は、光源（図示されていない）、プリズム34、プリズムとセンサーチ
ップ10との間の光学インターフェース38及び検出器（図示されていない）を
有する。光源としては、発光ダイオードを用いることが好ましく、例えば、波長

760 nmの偏光をプリズム34でくさび型の光に集光し、全反射の条件下でセンサーチップ10に照射する。センサーチップ10で反射したくさび型の反射光の強度を固定したダイオードアレイのような検出器でモニターする。これをコンピュータで解析することによりSPR角度を自動的に計算する。

- 5 マイクロ流路系は、基板40と、表面に窪み42が形成されているセル構造体42とを有する。窪み42では、3方が壁面となり上が開いた構造をしている。セル構造体42の上から蓋をするようにセンサーチップ10が装着することができ、これにより、フローセル46を形成することができる。フローセル46は、2以上有ることが好ましく、図5A及び図5Bでは、4つのフローセルが形成さ
- 10 れている。

- 4つのフローセル46に対応して、4つのセンサーチップ10が形成されている。即ち、図5Bに示す4つのフローセル46の各々に対応して、図3及び図4に示す基板12の表面上に金属薄膜14及び固定層16が形成されている。一方、図5Bでフローセルが配置されていない部分、例えば、フローセルの間の部分に
- 15 対応する基板12の表面には、金属薄膜14、固定層16が形成されていることを要しない。

フローセルにおいて、マイクロ流路系を流れてきた抗原がセンサーチップ10の表面に固定されている抗体19と結合する。

- 図6Aは、SPR装置のマイクロ流路系を示し、図6Bは、図6Aの一部分の
- 20 拡大断面図である。

マイクロ流路系50は、サンプル注入口52及びバッファ注入口54を有する。サンプル及びバッファは、シリンジポンプで注入することができ、1~100 μ l/minの範囲で一定の流速で送液をすることができることが好ましい。

- サンプルラック（図示されていない）に置かれた試料はオートサンプラー（図
- 25 示されていない）で自動的に混合、希釈され、サンプル注入口52から注入される。注入された溶液はマイクロ流路系を通過してフローセル46へ送られ、フローセル46においてセンサーチップ10の表面と接触する。

マイクロ流路系のサンプルループの高さは例えば、50 μ mである。サンプル

ループとフローセルの間には圧縮空気で作動する微小なダイアフラムバルブ 5 6 が複数組込まれており、マイクロ流路系の中のサンプルループ、フローセルへの送液を制御している。これらのバルブの開閉は試料の注入にあわせてコンピュータソフトで自動的に制御される。

- 5 図 7 は、マイクロ流路系のフローセル部分を示す。図 7 では、バルブ 4 8 b、4 8 c、4 9 c が開放され、バルブ 4 9 a、4 9 b、4 8 d が閉鎖されている。これにより、試料は、フローセル 4 6 a、4 6 b、4 6 c の順序に流れる。

例えば、フローセル 4 6 a に対応するセンサーチップには、抗エストラジオール-17 β 抗体を固定し、フローセル 4 6 b に対応するセンサーチップには、抗
10 ダイオキシン抗体を固定し、フローセル 4 6 c に対応するセンサーチップには、抗 PCB 抗体を固定することもできる。試料を 1 回、SPR 装置に導入するのみで、試料中のエストラジオール-17 β 、ダイオキシン、PCB を検出することができる。

このように、センサーチップが 2 以上の抗原に対する 2 以上の抗体を有してい
15 る場合には、一度の操作により、2 以上の抗原を検出することができ、効率的になる。

バルブの操作により、一つのフローセルに流すか、フローセルを順番に流すか、いくつかのモードを選択できる。マイクロ流路系の中では試料とバッファーの間にエアバルブで仕切られており、試料の希釈、拡散は最小限に抑えられ、サンプ
20 ルとセンサーチップ 1 0 との接触時間を正確に制御することができる。

図 8 A、8 B 及び 8 C は、競合法の説明図である。プラズモン共鳴分析では、センサーチップ 1 0 に固定されている抗体 1 9 に抗原 2 9 が結合することに起因する変化を、消失角度の変化で検出する。

しかし、抗原 2 9 の分子量が小さい場合には、消失角度の変化も小さくなるので、消失角度の変化を検出しがたいこともある。従って、抗原 2 9 の分子量が小さい場合には、次に説明するような競合法により、消失角度を検出することが
25 できる。

競合法では、標識抗原、即ち、適当な高分子化合物に結合した抗原を用いる。

標識抗原は、典型的には、抗原を高分子化合物にカップリングさせることにより得られる。このカップリング方法は、抗体を作成する際に、抗原ハプテンを適当な高分子化合物に結合させるのと同様の手法を用いることができる。例えば、図 1 3 及び図 1 4 に示すカップリング方法を用いることができる。また、高分子化合物としても同様のものを用いることができる。

そして、標識抗原について、及び、標識されていない抗原と標識抗原とを所定の割合で混合した 1 以上の混合物について、表面プラズモン共鳴用センサーチップを用いて消失角度を測定する。

図 8 A は、標識抗原 2 9 a を含有する標準サンプルを流路に流し、標識抗原 2 9 a がセンサーチップ 1 0 の抗体 1 9 に結合している。

図 8 B では、上記標準サンプルと、抗原 2 9 を含有するサンプルとを所定の割合で混合した混合物を流路に流している。混合物中の標識抗原 2 9 a と抗原 2 9 との割合に比例して、標識抗原 2 9 a 及び抗原 2 9 がセンサーチップ 1 0 の抗体 1 9 に結合している。

図 8 C では、図 8 B と同様に、上記標準サンプルと、抗原 2 9 を含有するサンプルとを所定の割合で混合した混合物を流路に流している。しかし、図 8 C では、抗原 2 9 を含有するサンプルの割合は、図 8 B よりも多くなっている。

即ち、図 8 A、図 8 B、図 8 C という順序で、標識抗原 2 9 の濃度が低下し、一方、抗原 2 9 の濃度が上昇している。ここで、標識抗原 2 9 a は、分子量が大きいので、この標識抗原 2 9 a の濃度の減少は、消失角度の変化として検出することができる。

実施例

スウェーデン、ウプサラ (Uppsala) のピアコア社が製造し、ピアコア株式会社（日本国東京都新宿区 1 0 0 人町 3 - 2 5 - 1）から入手可能な B I A core（登録商標）2 0 0 0 という S P R 装置を用いて、サンプル中のダイオキシンを測定した。

実施例 1

抗ダイオキシンモノクロナール抗体を、アミノカップリング法により、B I A

core (登録商標) 2000 を用いてセンサーチップに固定した。

抗体が固定されていないセンサーチップとしては、BIAcore 社から入手可能な商品名 CM5 のセンサーチップを用いた。このセンサーチップは、図 3 に示す構造を有する。金属薄膜 14 は、金からなり、その厚さは 50 nm である。固定本体 18 は、架橋構造を有しないカルボキシメチルデキストランであり、厚さは 100 nm である。

抗ダイオキシンモノクローナル抗体は、リサーチダイアグノスティック社 (Pleasant Hill Road, Flanders, ニュージャージー、米国; Research Diagnostics, Inc.) のカタログ番号、
10 PDI-Dioxin-30 を用いた。ホストとしてはマウスが用いられている。

この抗ダイオキシンモノクローナル抗体には、3.125 ml (3.2 mg/ml) に 10 mg IgG1 が含まれ、0.2 M PBS、pH 7.2 であり、0.05 % のアジ化ナトリウムが含まれている。

この抗ダイオキシンモノクローナル抗体の反応性は下記の通りである。

15	2, 3, 7, 8-TCDD	100 %
	2, 3, 7, 8-TCDF	4.6 %
	2, 3, 7-トリCDD	<20 %
	2, 3-DCDD	2.2 %
	2-CDD	0.3 %
20	1, 2, 4-トリCDD	<1.0 %

まず、BIAcore 社製のセンサーチップ CM5 を BIAcore (登録商標) 2000 にセットした。次いで、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) と N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の
25 混合溶液を BIAcore (登録商標) 2000 に注入し (5 μ l/min)、センサーチップ CM5 を活性化した。

1000 ppm の抗ダイオキシンモノクローナル抗体を遠心し、溶媒を交換した。最終的に 10 mM の酢酸環境液 100 マイクロリットルに溶解した。この溶液の 50 マイクロリットルを BIAcore (登録商標) 2000 に 1 分当たり 5 マイク

ロリットルの割合で BIAcore (登録商標) 2000 に注入し、抗ダイオキシンモノクローナル抗体をセンサーチップ表面に固定した。

エタノールアミンを注入し、センサーチップ表面の未反応活性部位をブロッキングした。最後に、0.1N塩酸を流し、洗浄した。

5 実施例 2

実施例 1 で得られたセンサーチップを用いて、競合法でダイオキシン類の検出をした。実施例 2 では、装置内の温度は 25 度に維持した。

まず、BIAcore 2000 の内部で 7.6 ppm の 2, 3, 7, 8-TCDD / メタノール溶液をランニング緩衝液で 76-3.8 ppb に希釈した。ランニング緩衝液 (HBS) の組成は、0.01 M HEPES、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Polysorbate 20 (v/v) を含む水溶液である。

希釈した各濃度の 2, 3, 7, 8-TCDD 溶液を 10 ppm の HRP-2, 3, 7, 8-TCDD と BIAcore 内で混合した。HRP-2, 3, 7, 8-TCDD とは、アミノカップリング法により、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) で標識された HRP-2, 3, 7, 8-TCDD をいう。2, 3, 7, 8-TCDD そのものが抗体に結合することによる消失角度の変化は SPR では測定できないほど小さいので、標識された 2, 3, 7, 8-TCDD を用いた。

次いで、この混合液を BIAcore 2000 に注入 ($3 \mu\text{l}/\text{min}$) し、SPR シグナルを測定し、消失角度を求めた。即ち、波長 760 nm の偏光を照射し、その反射光の強度を測定し、入射光の入射角を変化させた。なお、各測定の間には 0.1 N 塩酸により、洗浄した。

結果を表 4 及び図 9 に示す。

表 4

ダイオキシン濃度	3.8 ppb	7.6 ppb	76 ppb
ΔRU	256.5	230.6	170.6
	273.7	230.3	152.4
	272.3	223.5	146.3
	136.5	107.2	74.3
平均	234.75	197.9	135.9

4つのセルから得られるデータを平均し、図9に示すグラフを作成した。HR P-2, 3, 7, 8-TCDD結合の減少は、2, 3, 7, 8-TCDDが抗体に結合したことを示す。

- 5 なお、1000RUは、消失角度0.1度に相当する。通常、SPR測定では、消失角度の変化が小さいのでレゾナンスユニット(RU)を使う。

また、図10に、抗ダイオキシンモノクローナル抗体を固定後の時間と、応答値との相関を示す。

実施例3

- 10 抗エストラジオール抗体を、アミノカップリング法により、BIAcore(登録商標)2000を用いてセンサーチップに固定した。BIAcore(登録商標)2000の内部の操作は、25℃で行った。

- 15 抗体が固定されていないセンサーチップとしては、BIAcore社から入手可能な商品名CM5のセンサーチップを用いた。このセンサーチップは、図3に示す構造を有する。金属薄膜14は、金からなり、その厚さは50nmである。固定本体18は、架橋構造を有しないカルボキシメチルデキストランであり、厚さは100nmである。

抗エストラジオール抗体としては、コスモバイオ株式会社(〒135-0016 日本国東京都江東区東陽2-2-20)から入手したエストラジオール抗血

清、F K A 2 0 4 を用いた。この抗原は、6 - オキソーエストラジオール - 6 - C M O - B S A I g G である。

ランニング緩衝液としては、BIAcore 社製の HBS 緩衝液を用いた。この緩衝液には、10mM HEPES、15mM NaCl、3mM EDTA、0.005%v/v Surfactant P20、pH7.4
5 が含まれている。

まず、BIAcore 社製のセンサーチップ C M 5 を BIAcore (登録商標) 2 0 0 0 にセットした。次いで、N - エチル - N ' - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) と N - ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の混合溶液を BIAcore (登録商標) 2 0 0 0 に注入し (5 μ l/min)、センサーチップ C M 5 を活性化した。
10

エストラジオール抗血清 (コスモバイオ社製) を 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8) で 50 倍に希釈した。最終液量は 1 0 0 μ L であった。この溶液の 5 0 マイクロリットルを BIAcore (登録商標) 2 0 0 0 に 1 分当たり 5 マイクロリットルの割合で BIAcore (登録商標) 2 0 0 0 に注入し、抗エストラジオールモノクローナル抗体をセンサーチップ表面に固定した。
15

40 μ L の 1 M エタノールアミン (pH 8.5) を注入し、センサーチップ表面の未反応活性部位をブロッキングした。最後に、5 μ L の 0.1 N 塩酸を流し、洗浄した。

実施例 4

20 実施例 3 で得られたセンサーチップを用いて、競合法でエストラジオールを検出した。実施例 4 では、装置内の温度は 2 5 度に維持した。ランニング緩衝液としては、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) を用いた。

所定の濃度に調整された複数のエストラジオール溶液を用いた。各々のエストラジオール溶液、1 体積部と、1 0 p p m の H R P 標識エストラジオール、4 体積部とを、BIAcor 2 0 0 0 の内部で混合した。H R P 標識エストラジオールとは、
25 アミノカップリング法により、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (H R P) で標識されたエストラジオールをいう。

次いで、各々の混合液 3 5 μ l を BIAcore 2 0 0 0 に注入 (5 μ l/min) し、S P R シグナルを測定し、消失角度を求めた。即ち、波長 7 6 0 nm の偏光を照

射し、その反射光の強度を測定し、入射光の入射角を変化させた。

さらに 100 ppm の抗 HRP 抗体 50 μ L を BIAcore に注入 (5 μ l/min) し、反応させ、消失角度を測定した。このように、競合法とサンドイッチ法とを併用することができる。

5 なお、各測定の間には 0.1N 塩酸により、洗浄した。

50 ppm の HRP 標識エストラジオール (コスモバイオ社製) の緩衝液をモルカット (ミリポア社製; 分画分子量 10,000) を用いて交換した。

抗 HRP 抗体は、1000 ppm の抗 HRP 抗体 (バイオメダ社製) の緩衝液をモルカット (ミリポア社製; 分画分子量 10,000) を用いて交換し、100 ppm に

10 希釈した。

結果を表 5 及び図 1-1 に示す。4つのセルから得られるデータを平均し、図 1-1 に示すグラフを作成した。

表 5

エストラジオール濃度	0.01 ppm		0.05 ppm		0.1 ppm		0.5 ppm		1 ppm	
Δ RU	188.7	187.1	188.3	185.4	188.6	191.2	191.1	185.1	148.1	188.7
	187.4	189.2	189.9	184.1	183.4	187.4	174.1	181.6	156.8	160.1
	187.7	189.3	190.4	184.7	183.1	187.9	176.0	183.1	179.6	168.4
	242.8	244.8	244.2	240.0	237.2	243.0	224.9	235.3	212.1	211.0
平均	202.1		200.9		200.2		193.9		178.1	

本発明は、表面プラズモン共鳴を利用することにより、高感度に抗原を検出することができる。例えば、約0.1 ppbの感度に達する場合もある。また、抗原を定性的、定量的に検出することもできる。更に、従来のGC-MS法、酵素反応を用いる方法に比較し、操作が簡単である。

5 また、本発明では、抗原、抗体反応を用いるので、選択性が優れている。本発明では、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモン等、性ホルモン等、又は環境ホルモンに対する抗体と結合する物質を検出することができる。このような物質は新たな環境ホルモンの可能性があり、環境ホルモンのスクリーニングとして有用である。

10 本発明は、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモン等、性ホルモン等、若しくは環境ホルモンの検出、及び、環境ホルモンのスクリーニングに限られず、性ホルモンの分泌異常の検査（例えば、不妊検査）、妊娠検査、更年期障害検査、スポーツ選手等のドーピング検査などの各種検査にも応用することができる。

請求の範囲

1. 金属薄膜と、

- ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、及び、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた 1 以上の抗原に対する 1 以上の抗体と、

前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、

を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

- 10 2. 前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

3. 前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

- 15 4. 前記抗体が、エストロゲンに対する抗体である請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

5. 前記抗体が、環式炭化水素部分を有する環境ホルモンに対する抗体である請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

- 20 6. 前記抗体が、ダイオキシン類に対する抗体である請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

7. 前記抗体が、前記固定層に共有結合により固定されている請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

8. 前記固定層が、1 以上の有機薄膜層を含む請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

- 25 9. 前記有機薄膜層が、金属薄膜を被覆しているリンカー層を有する請求項 8 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

10. 前記有機薄膜層が、ヒドロゲル層を有する請求項 8 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

11. 前記有機薄膜層が、ストレプトアビジン層を有する請求項 8 に記載の表面

プラズモン共鳴用センサーチップ。

1 2. 前記有機薄膜層が、疎水性層を有する請求項 8 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

1 3. 前記疎水性層が、金属薄膜と結合をするシリコン原子を含む請求項 1 2 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

1 4. 前記金属薄膜は、入射光が照射される照射面と前記照射面の反対側の検出面とを有し、前記固定層は前記金属薄膜の前記検出面に被覆している請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

1 5. 前記金属薄膜の前記照射面が、照射光を透過させることができる基板を被覆している請求項 1 4 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

1 6. 2 以上の前記抗原に対する 2 以上の前記抗体を有する請求項 1 に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

1 7. 金属薄膜と、ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、及び、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた 1 以上の抗原に対する 1 以上の抗体と、前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップの前記抗体をサンプルに曝露する工程と、

前記金属薄膜に光を照射する工程と、

2 0. 前記金属薄膜からの反射光の強度を検出する工程と、
を有する抗原の検出方法。

1 8. 前記反射光の消失角度の移動を求める工程を更に有する請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

1 9. 前記曝露工程の前に、標識物質と前記抗原とが結合した標識抗原を前記抗体に結合させる工程を更に有する請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

2 0. 前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

2 1. 前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

2 2. 前記抗体が、エストロゲンに対する抗体である請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

2 3. 前記抗体が、環式炭化水素部分を有する環境ホルモンに対する抗体である請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

5 2 4. 前記抗体が、ダイオキシン類に対する抗体である請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

2 5. 前記表面プラズモン共鳴用センサーチップが 2 以上の前記抗原に対する 2 以上の前記抗体を有していて、2 以上の抗原を検出することができる請求項 1 7 に記載の抗原の検出方法。

10 2 6. 金属薄膜と、

ステロイド骨格を有する物質、ステロイドホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、性ホルモンの生理作用を維持、促進又は阻害する物質、及び、環境ホルモン（ただし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた 1 以上の抗原に対する 1 以上の抗体と、

15 前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、
を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップと；

前記表面プラズモン共鳴用センサーチップに照射光を照射するための光源と、

前記表面プラズモン共鳴用センサーチップからの反射光を検出するための検出器と、

20 少なくとも照射光が透過するプリズムと、
を有する光学系と；

前記表面プラズモン共鳴用センサーチップの前記抗体にサンプルを接触させるための流路系と；

を有する表面プラズモン共鳴装置。

25 2 7. 前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項 2 6 に記載の表面プラズモン共鳴装置。

2 8. 前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項 2 6 に記載の表面プラズモン共鳴装置。

2 9. 前記抗体が、エストロゲンに対する抗体である請求項 2 6 に記載の表面プ

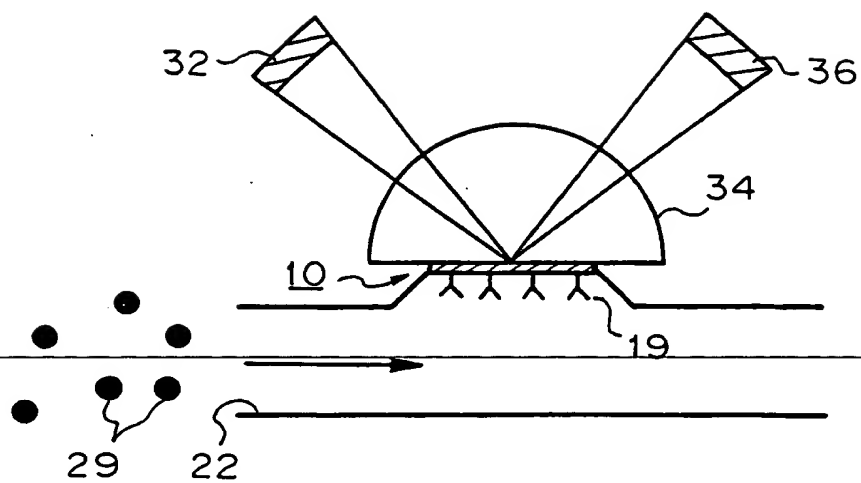
ラズモン共鳴装置。

30. 前記抗体が、環式炭化水素部分を有する環境ホルモンに対する抗体である請求項26に記載の表面プラズモン共鳴装置。

5 31. 前記抗体が、ダイオキシン類に対する抗体である請求項26に記載の表面プラズモン共鳴装置。

32. 前記流路系が、フローセルを有していて、前記表面プラズモン共鳴用センサーチップが前記フローセルに対応した位置に配置されている請求項26に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

図 1A



抗原抗体反応

図 1B

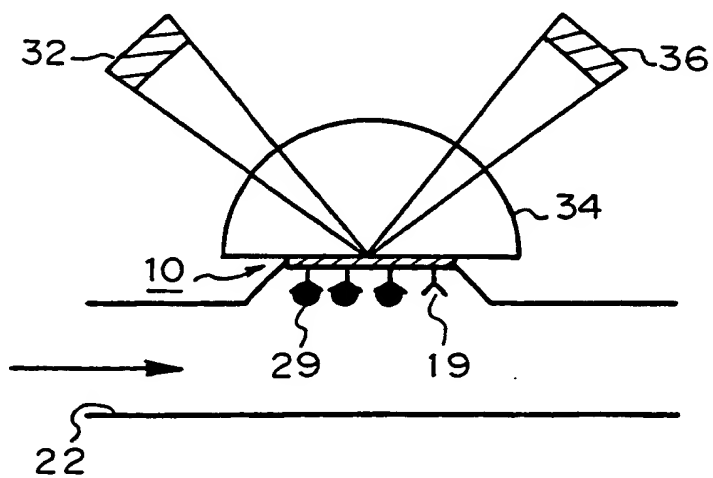


図 2A

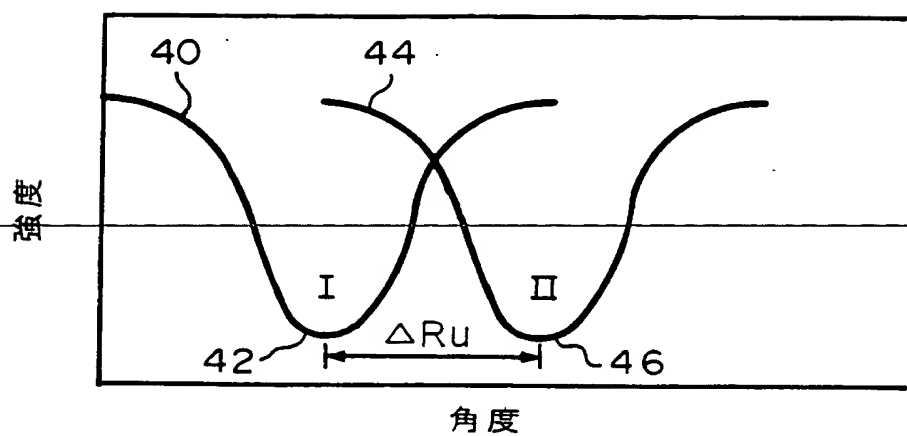


図 2B

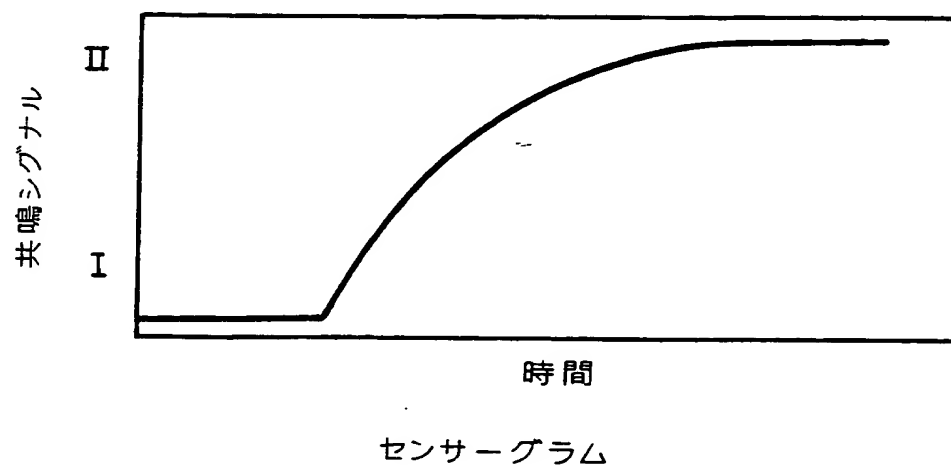


図 3

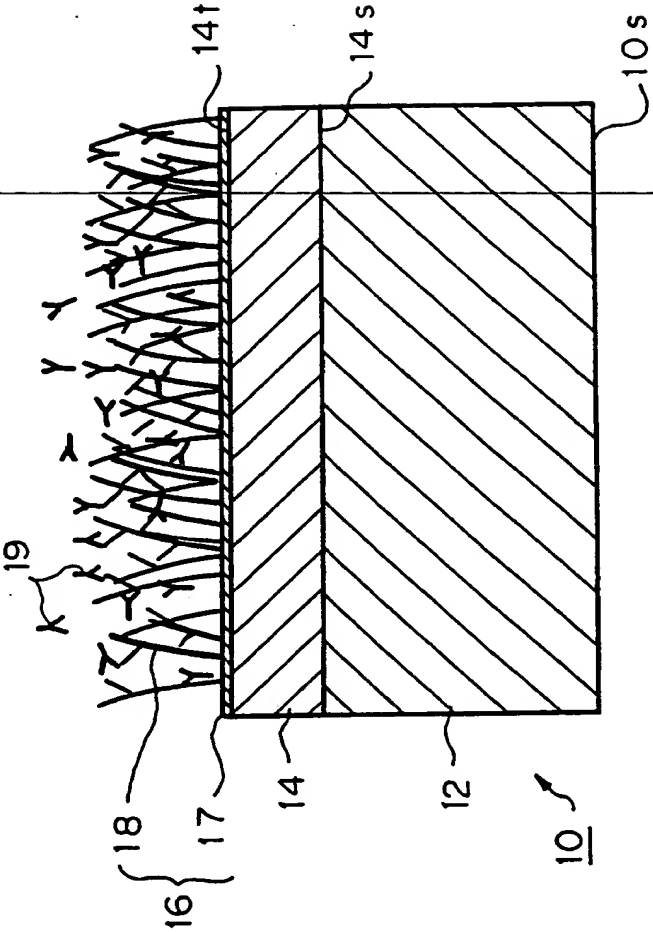


図 4

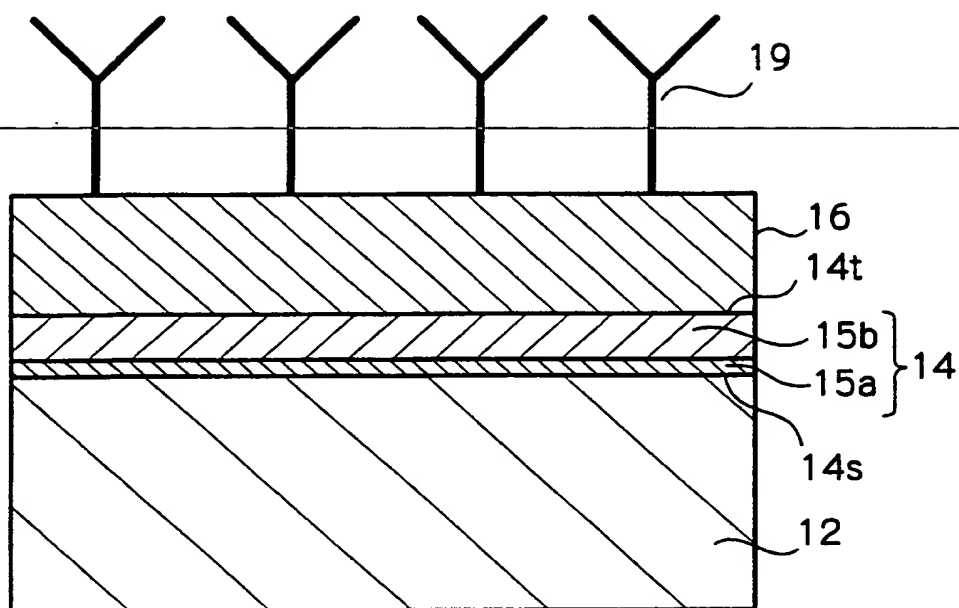


図 5A

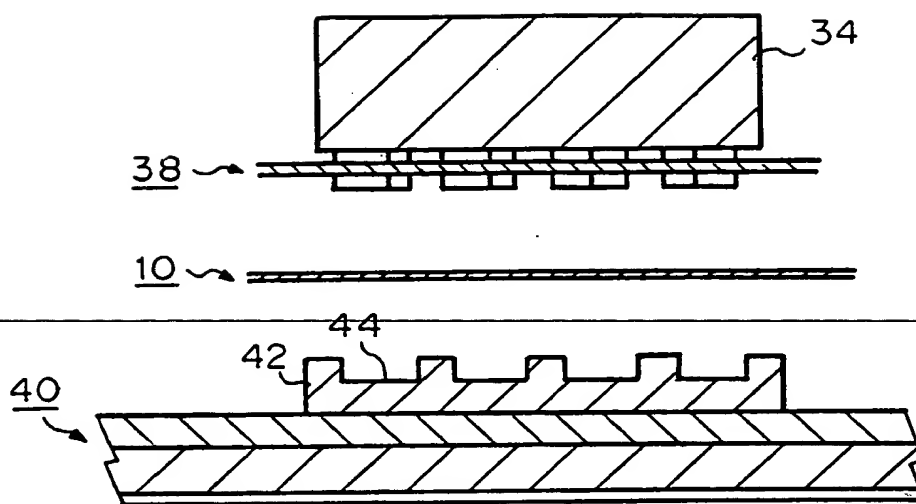


図 5B

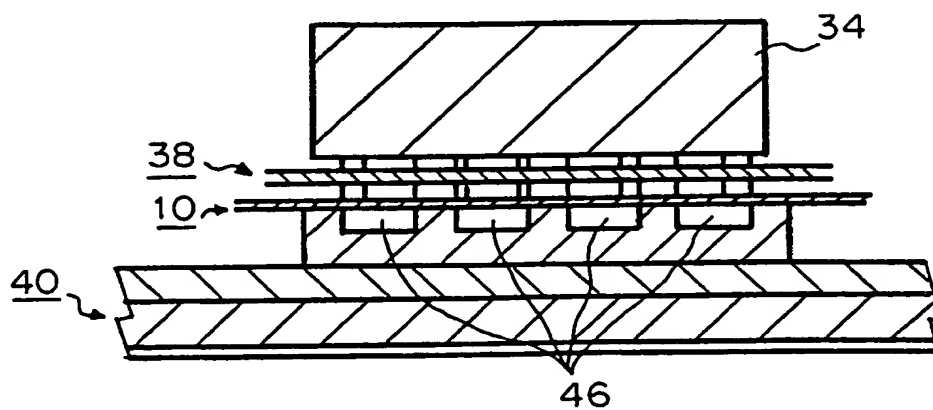


図 6A

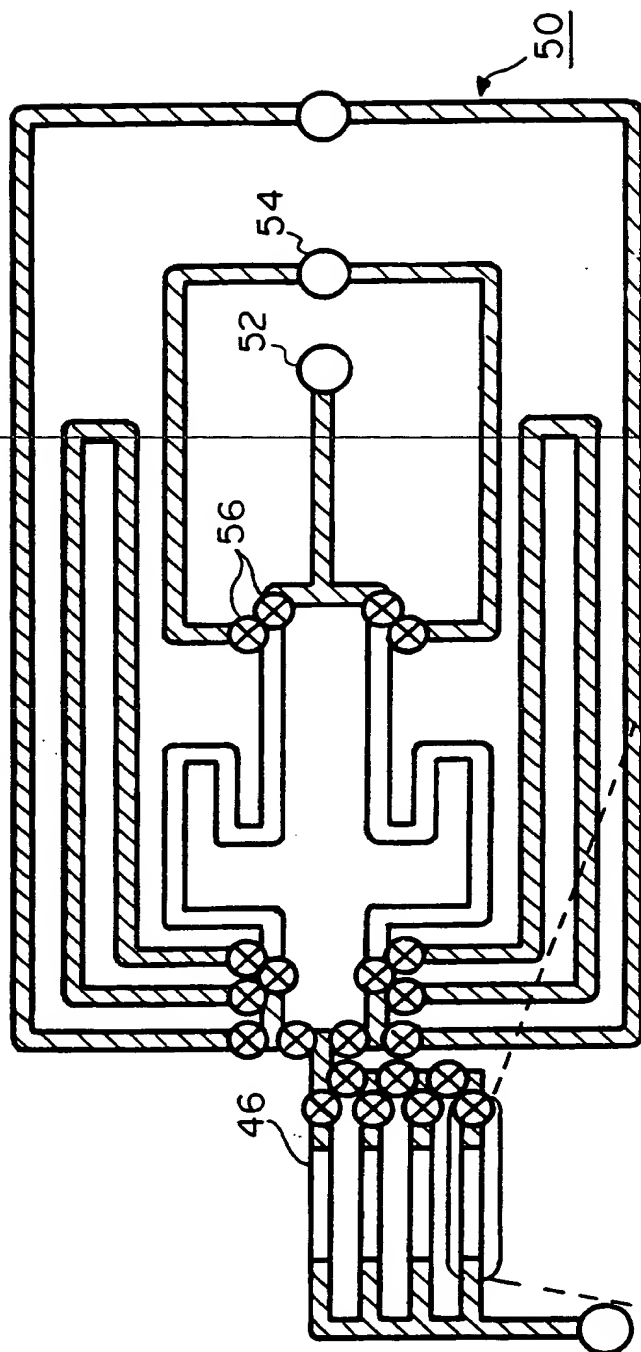


図 6B

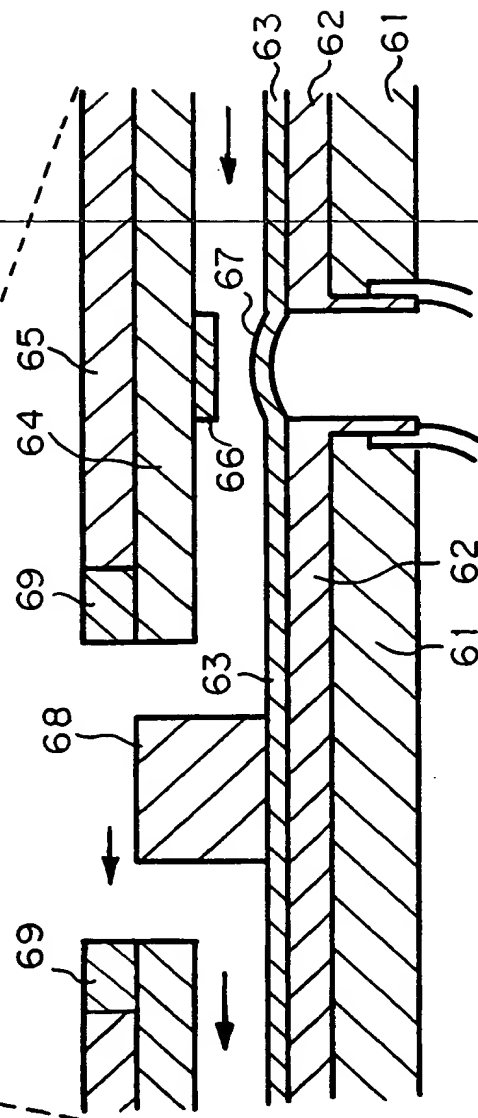
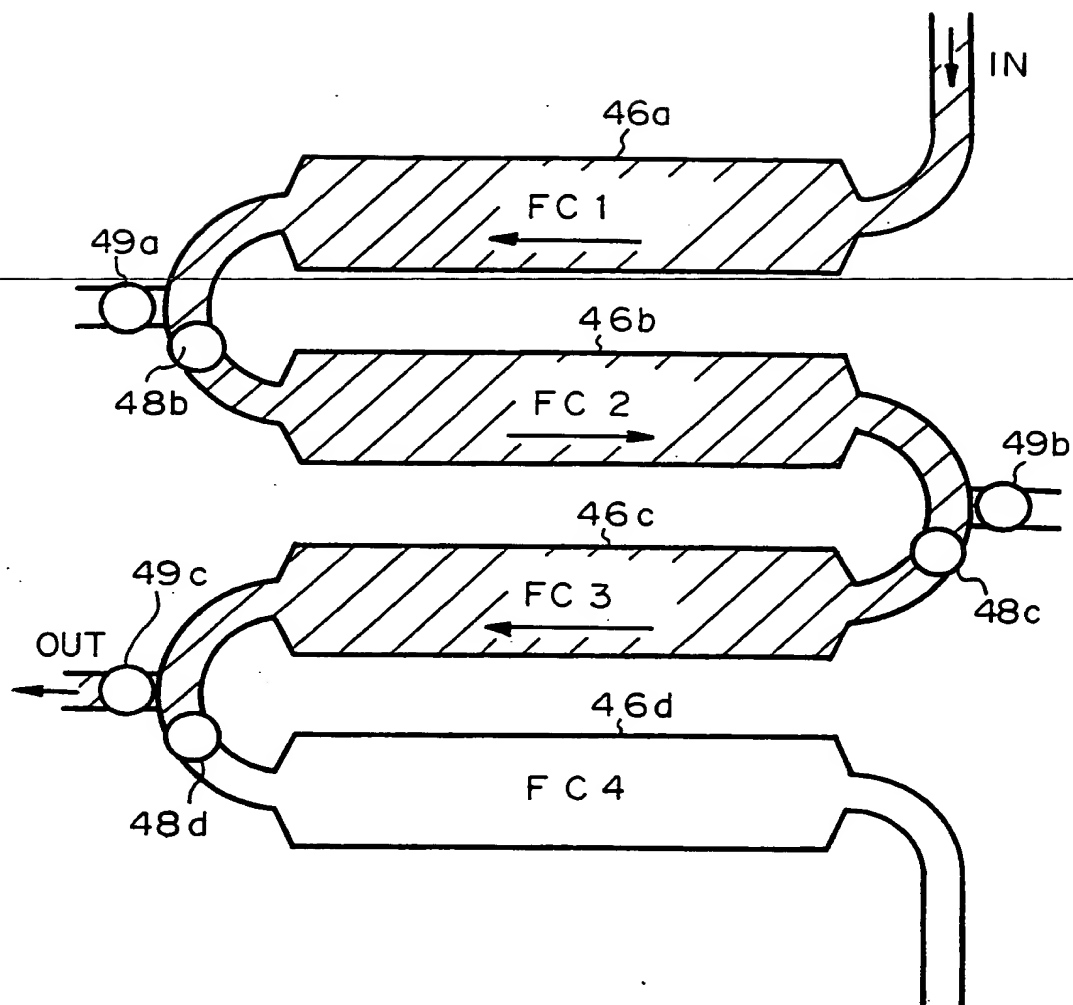


図 7



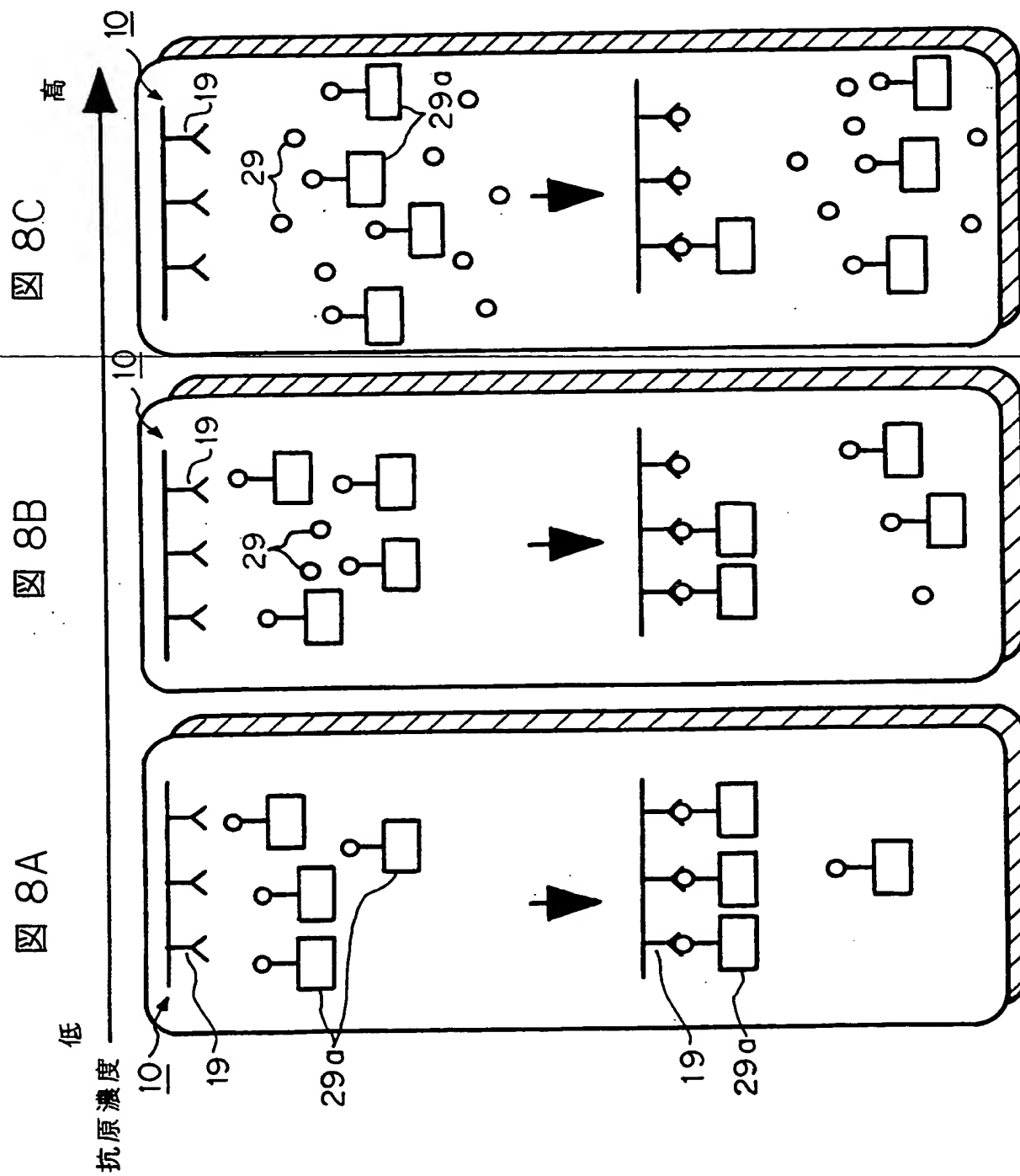


図 9

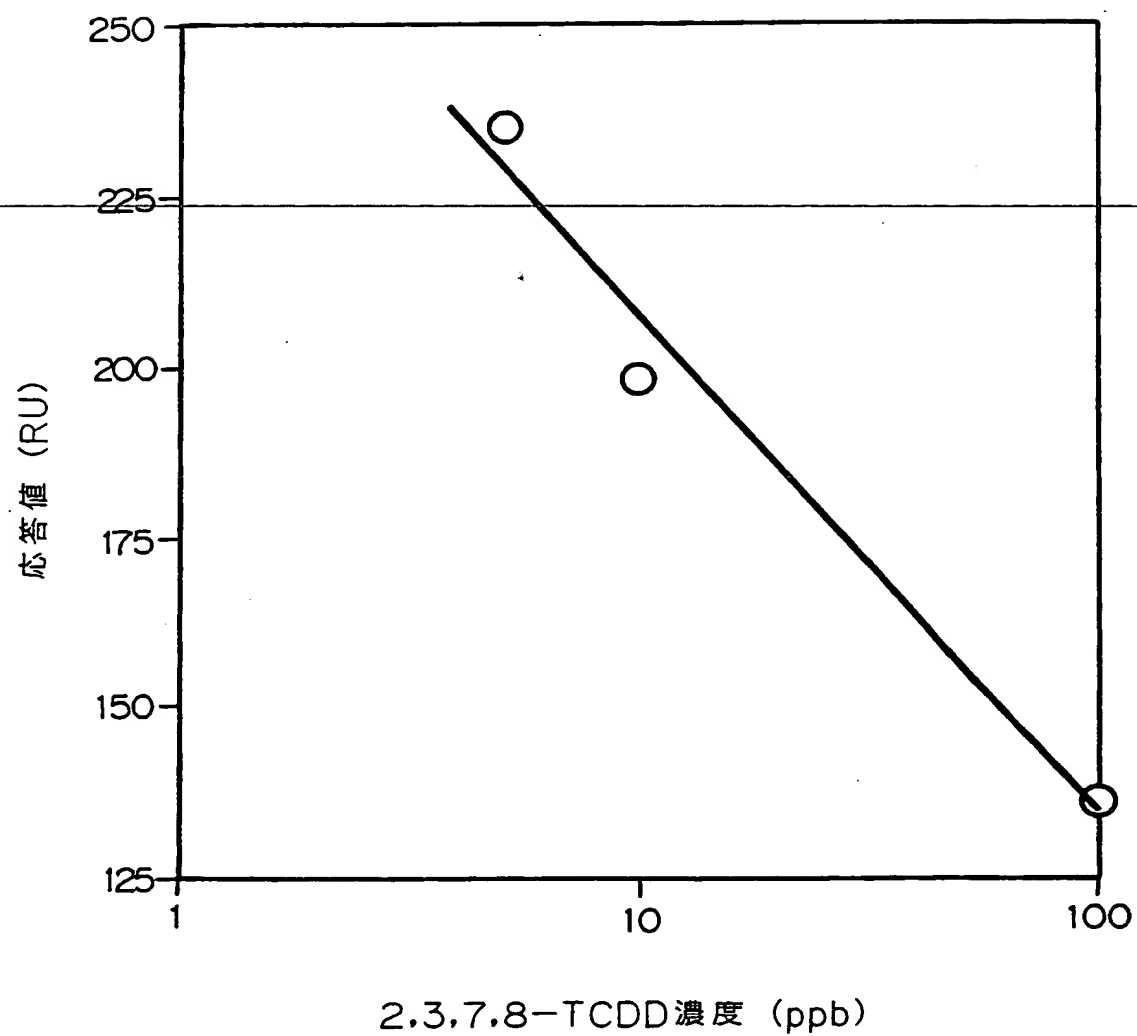


図 10

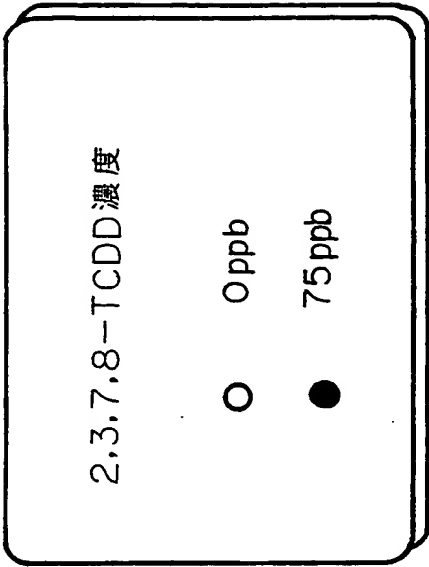
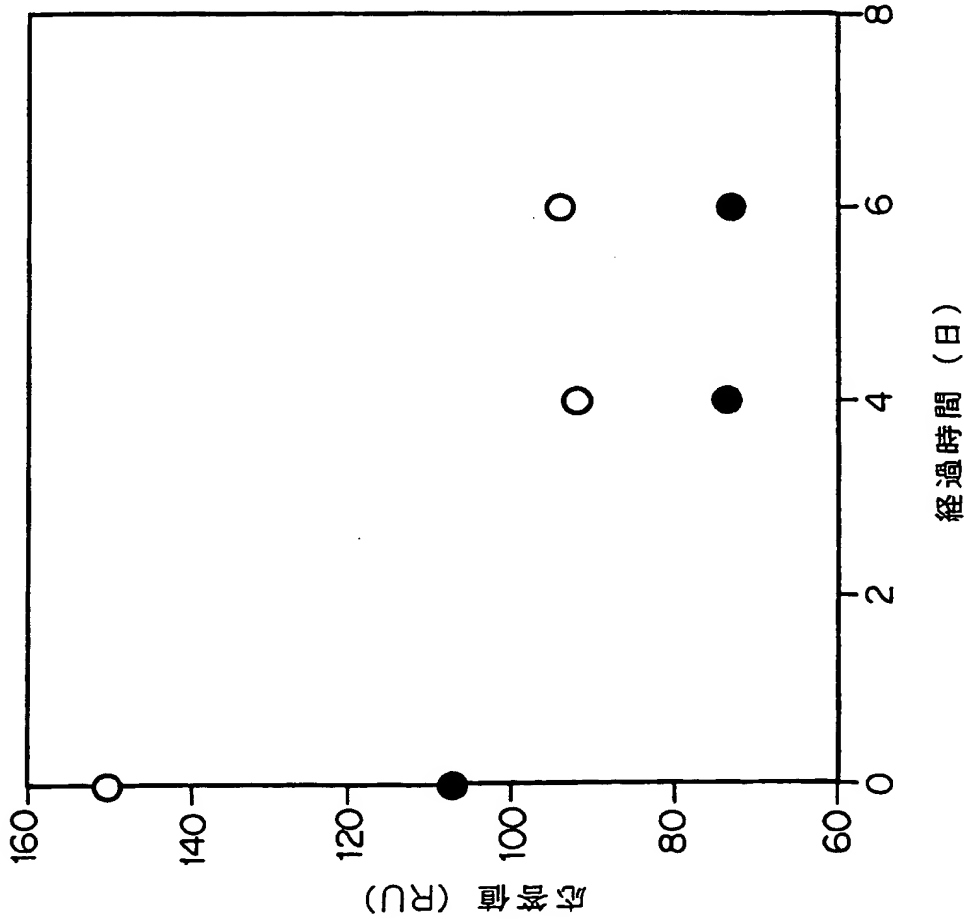


図 11

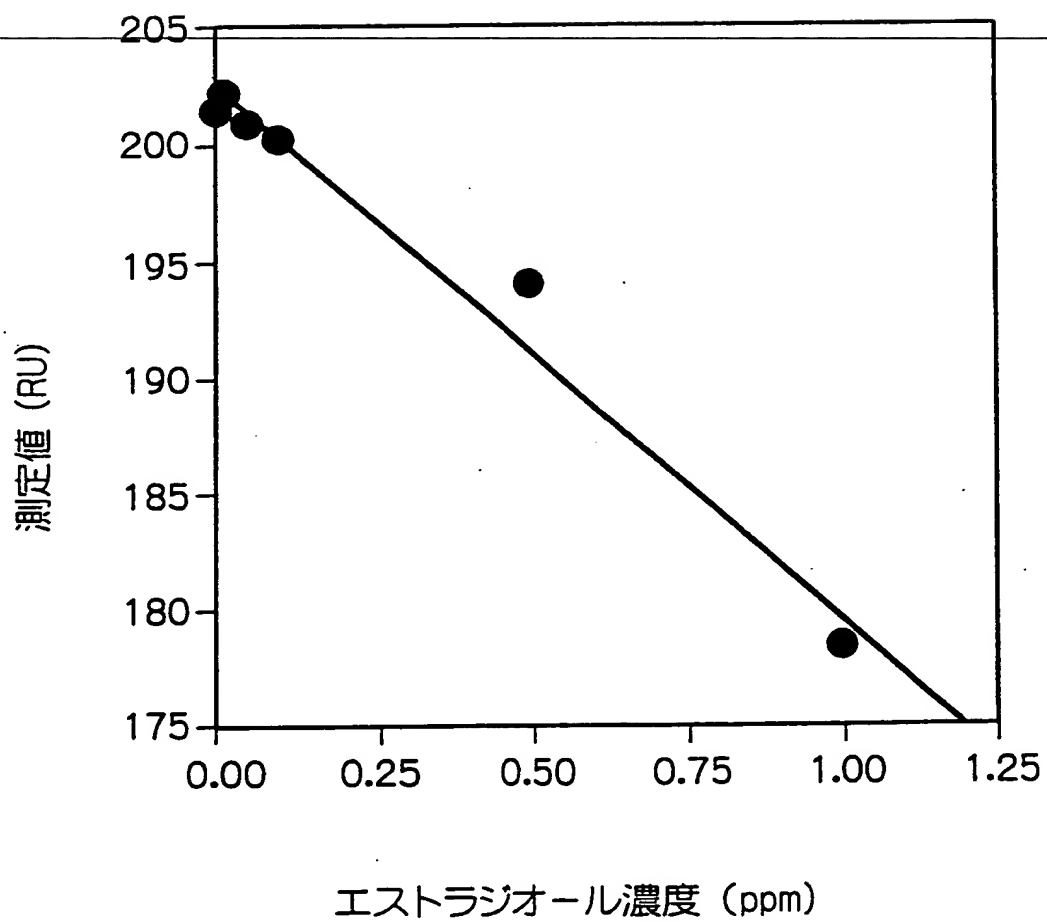


図 12

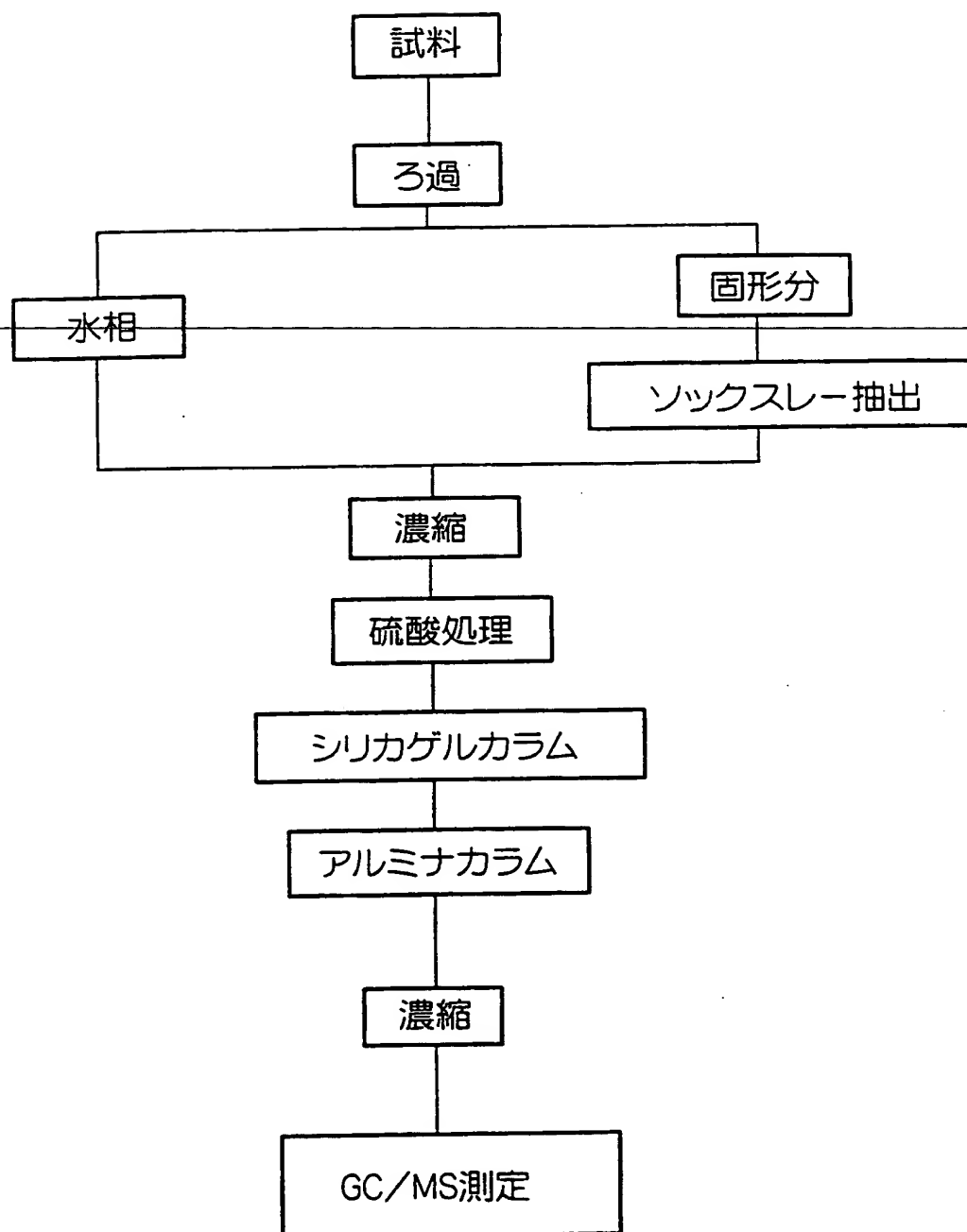
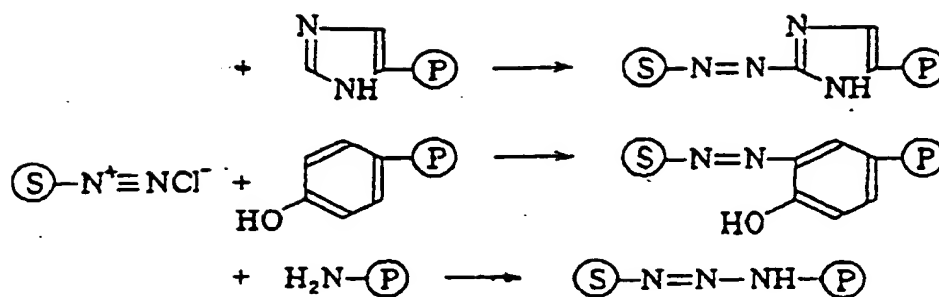
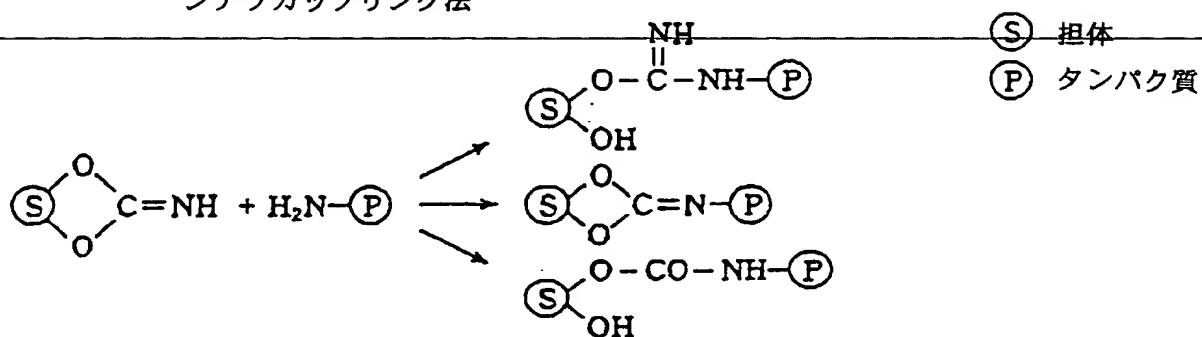


図 13



ジアゾカップリング法



イミドカルボナートを介したカップリング法
(多糖類の臭化シアンによる活性化)

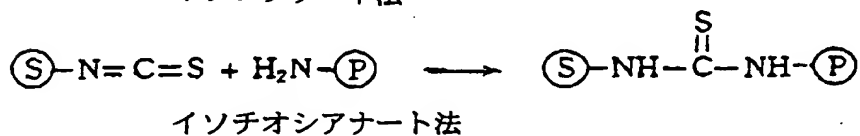
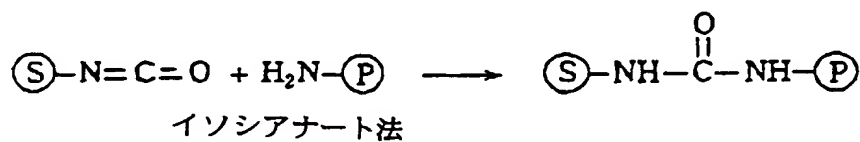
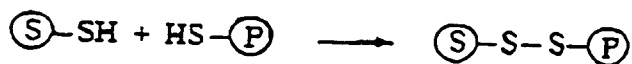


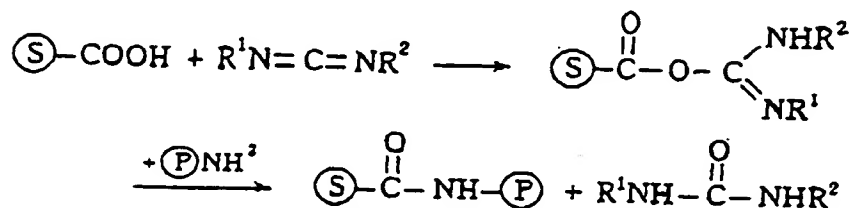
図 14



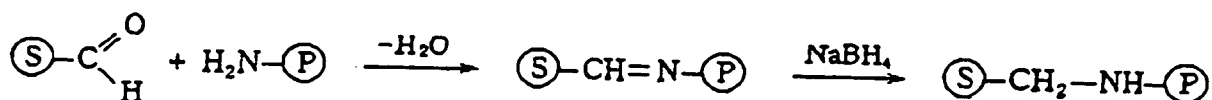
エポキシ基によるカップリング法



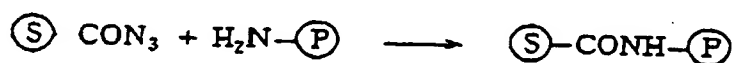
チオール-ジスルフィド交換反応法



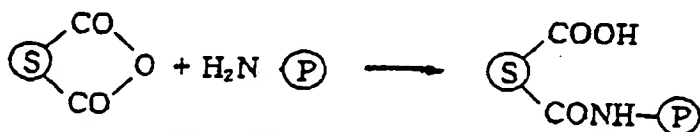
カルボジイミド法



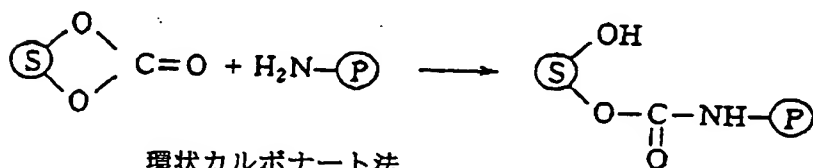
シッフ塩基形成法



アジド法



酸無水物法



環状カルボナート法

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ G01N33/543Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. Morgan & D.M. Taylor "A Surface plasmon resonance immnosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7 (1992), p405-410	1, 3, 4, 7-9, 11, 14-19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 32
Y		2, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 27, 30, 31
Y	JP, 1-109262, A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 26 April, 1989 (26. 04. 89) (Family: none)	2, 4, 20, 22, 27, 29
Y	JP, 63-14691, A (The Regents of the University of California), 21 January, 1988 (21. 01. 88) & EP, 251635, A & US, 479887, A & DE, 3750354, A	5, 6, 23, 24, 30, 31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
6 April, 1999 (06. 04. 99)Date of mailing of the international search report
13 April, 1999 (13. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanes Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 4-501605, A (Pharmacia Biosensor AB.), 19 March, 1992 (19. 03. 92) & SE, 8804073, A & WO, 9005303, A & EP, 589867, A & US, 5436161, A & DE, 68926255, A & AT, 136651, A	10
Y	JP, 10-267834, A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 9 October, 1998 (09. 10. 98) (Family: none)	12, 13
A	Bun Takeyama et al., "Kakunai juyoutai to koakuchibeetaa no sougo sayou o shihyou to shita hormone you kassei sokuteihou", Dai 24 kai Kankyou Tokisokorojii symposium, Dai 2 kai Eisei Yakugaku Forum Goudou Taikai Kouen Youshishuu (05. 98. 12) p81	1-32

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/00066

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JOIS, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	H. Morgan & D. M. Taylor "A Surface plasmon resonance immnosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7 (1992), p405-410	1, 3, 4, 7-9, 11, 14-19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 32
Y		2, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 27, 30, 31

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.04.99

国際調査報告の発送日

13.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 6630

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 1-109262, A (栄研化学株式会社) 26. 4月. 1989 (26. 04. 89) (ファミリーなし)	2, 4, 20, 22, 27, 29
Y	J P, 63-14691, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & EP, 251635, A & US, 479887, A & DE, 3750354, A	5, 6, 23, 24, 30, 31
Y	J P, 4-501605, A (ファーマシア・バイオセンソル・アクチボラッグ) 19. 3月. 1992 (19. 03. 92) & SE, 8804073, A & WO, 9005303, A & EP, 589867, A & US, 5436161, A & DE, 68926255, A & AT, 136651, A	10
Y	J P, 10-267834, A (大日本印刷株式会社) 9. 10月. 1998 (09. 10. 98) (ファミリーなし)	12, 13
A	嶽山 文ら「核内受容体とコアクチベーターの相互作用を指標としたホルモン様活性測定法」第24回環境トキシコロジーシンポジウム・第2回衛生薬学フォーラム合同大会講演要旨集, (05. 98. 12) p 81	1-32

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 18 FEB 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-381	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00066	国際出願日 (日.月.年) 12.01.99	優先日 (日.月.年)
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ G01N33/543		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社荏原製作所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>2</u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.05.99	国際予備審査報告を作成した日 19.01.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中靖典	2J 9507
電話番号 03-3581-1101		内線 3252

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-42 ページ、
 明細書 第 _____ ページ、
 明細書 第 _____ ページ、
 出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2-16, 18-32 項、
 請求の範囲 第 _____ 項、
 請求の範囲 第 1, 17 項、
 請求の範囲 第 _____ 項、
 出願時に提出されたもの
 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1/14-14/14 ページ/図、
 図面 第 _____ ページ/図、
 図面 第 _____ ページ/図、
 出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
 出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-32

有
無

請求の範囲

進歩性(I S)

請求の範囲

1-32

有
無

請求の範囲

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-32

有
無

請求の範囲

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: H. Morgan & D. M. Taylor "A surface plasmon resonance immunosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7(1992)

文献2: 橋本せつ子、「表面プラズモン共鳴現象を利用する生体分子相互作用の解析」、ぶんせき、1997(5)362~368

文献3: J P, 1-109262, A (栄研化学株式会社) 26. 4月. 1989 (26. 04. 89)

文献4: J P, 63-14691, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ イ オブ カリフォルニア) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88)

請求の範囲1~16, 17~25, 26~32に対して

文献1、2には、測定試料に対する抗体と前記抗体を固定する固定層と、を有する表面プラズモン共鳴センサチップが記載されている。

また文献1には、抗体の固定方法としてアミノカップリング法を用いること、そしてセンサ表面に、ヒドロゲル(カルボキシデキストラン)層を有すること、ストレプトアビジン層を有していること、金属薄膜層を有していること、疎水性表面を有すること、が記載されている。

文献3には、性ホルモンであるエストロンに対する抗体が、また文献4には、モノクローナル抗体を用いたダイオキシンの測定法が記載されているが、これらを文献1、2の表面プラズモン共鳴センサチップに適用することについては何ら記載されていない。

請求の範囲

1. (補正後) 金属薄膜と、

ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質、性
5 ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質、及び、環境ホルモン（た
だし、トリアジン系化合物を除く）から選ばれた1以上の抗原に対する1以上の
抗体と、

前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、

を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップ。／

10 2. 前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用
を示す物質に対する抗体である請求項1に記載の表面プラズモン共鳴用センサー
チップ。

3. 前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対す
る抗体である請求項1に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

15 4. 前記抗体が、エストロゲンに対する抗体である請求項1に記載の表面プラズ
モン共鳴用センサーチップ。

5. 前記抗体が、環式炭化水素部分を有する環境ホルモンに対する抗体である請
求項1に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

20 6. 前記抗体が、ダイオキシン類に対する抗体である請求項1に記載の表面プラ
ズモン共鳴用センサーチップ。

7. 前記抗体が、前記固定層に共有結合により固定されている請求項1に記載の
表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

8. 前記固定層が、1以上の有機薄膜層を含む請求項1に記載の表面プラズモン
共鳴用センサーチップ。

25 9. 前記有機薄膜層が、金属薄膜を被覆しているリンカー層を有する請求項8に
記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

10. 前記有機薄膜層が、ヒドロゲル層を有する請求項8に記載の表面プラズモ
ン共鳴用センサーチップ。

11. 前記有機薄膜層が、ストレプトアビジン層を有する請求項8に記載の表面

プラズモン共鳴用センサーチップ。

12. 前記有機薄膜層が、疎水性層を有する請求項8に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

13. 前記疎水性層が、金属薄膜と結合をするシリコン原子を含む請求項12に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

14. 前記金属薄膜は、入射光が照射される照射面と前記照射面の反対側の検出面とを有し、前記固定層は前記金属薄膜の前記検出面に被覆している請求項1に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

15. 前記金属薄膜の前記照射面が、照射光を透過させることができる基板を被覆している請求項14に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。

~~16. 2以上の前記抗原に対する2以上の前記抗体を有する請求項1に記載の表面プラズモン共鳴用センサーチップ。~~

17. (補正後) 金属薄膜と、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質、及び、環境ホルモン(ただし、トリアジン系化合物を除く)から選ばれた1以上の抗原に対する1以上の抗体と、前記抗体を前記金属薄膜に固定するための固定層と、を有する表面プラズモン共鳴用センサーチップの前記抗体をサンプルに曝露する工程と、

前記金属薄膜に光を照射する工程と、

20. 前記金属薄膜からの反射光の強度を検出する工程と、
を有する抗原の検出方法。

18. 前記反射光の消失角度の移動を求める工程を更に有する請求項17に記載の抗原の検出方法。

19. 前記曝露工程の前に、標識物質と前記抗原とが結合した標識抗原を前記抗体に結合させる工程を更に有する請求項17に記載の抗原の検出方法。

20. 前記抗体が、ステロイドホルモン又はステロイドホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項17に記載の抗原の検出方法。

21. 前記抗体が、性ホルモン又は性ホルモンと同様の生理作用を示す物質に対する抗体である請求項17に記載の抗原の検出方法。

P C T

E P



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-381	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/00066	国際出願日 (日.月.年) 12.01.99	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 株式会社荏原製作所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 3 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G 01 N 33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G 01 N 33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JOIS、BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	H. Morgan & D. M. Taylor "A Surface plasmon resonance immnosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7 (1992), p405-410	1, 3, 4, 7-9, 11, 14-19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 32
Y		2, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 27, 30, 31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.04.99

国際調査報告の発送日

13.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
竹中 靖典



2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 6630

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 1-109262, A (栄研化学株式会社) 26. 4月. 1989 (26. 04. 89) (ファミリーなし)	2, 4, 20, 22, 27, 29
Y	J P, 63-14691, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & EP, 251635, A & US, 479887, A & DE, 3750354, A	5, 6, 23, 24, 30, 31
Y	J P, 4-501605, A (ファーマシア・バイオセンソル・アクチボラッグ) 19. 3月. 1992 (19. 03. 92) & SE, 8804073, A & WO, 9005303, A & EP, 589867, A & US, 5436161, A & DE, 68926255, A & AT, 136651, A	10
Y	J P, 10-267834, A (大日本印刷株式会社) 9. 10月. 1998 (09. 10. 98) (ファミリーなし)	12, 13
A	嶽山 文ら「核内受容体とコアクチベーターの相互作用を指標としたホルモン様活性測定法」第24回環境トキシコロジーシンポジウム・第2回衛生薬学フォーラム合同大会講演要旨集, (05. 98. 12) p 81	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ G01N33/543Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. Morgan & D.M. Taylor "A Surface plasmon resonance immnosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7 (1992), p405-410	1, 3, 4, 7-9, 11, 14-19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 32
Y		2, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 27, 30, 31
Y	JP, 1-109262, A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 26 April, 1989 (26. 04. 89) (Family: none)	2, 4, 20, 22, 27, 29
Y	JP, 63-14691, A (The Regents of the University of California), 21 January, 1988 (21. 01. 88) & EP, 251635, A & US, 479887, A & DE, 3750354, A	5, 6, 23, 24, 30, 31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
6 April, 1999 (06. 04. 99)Date of mailing of the international search report
13 April, 1999 (13. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 4-501605, A (Pharmacia Biosensor AB.), 19 March, 1992 (19. 03. 92) & SE, 8804073, A & WO, 9005303, A & EP, 589867, A & US, 5436161, A & DE, 68926255, A & AT, 136651, A	10
Y	JP, 10-267834, A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 9 October, 1998 (09. 10. 98) (Family: none)	12, 13
A	Bun Takeyama et al., "Kakunai juyoutai to koakuchibeetaa no sougo sayou o shiyou to shita hormone you kassei sokuteihou", Dai 24 kai Kankyou Tokisokorojii symposium, Dai 2 kai Eisei Yakugaku Forum Goudou Taikai Kouen Youshishuu (05. 98. 12) p81	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ G01N33/543Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. Morgan & D.M. Taylor "A Surface plasmon resonance immnosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7 (1992), p405-410	1, 3, 4, 7-9, 11, 14-19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 32
Y		2, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 27, 30, 31
Y	JP, 1-109262, A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 26 April, 1989 (26. 04. 89) (Family: none)	2, 4, 20, 22, 27, 29
Y	JP, 63-14691, A (The Regents of the University of California), 21 January, 1988 (21. 01. 88) & EP, 251635, A & US, 479887, A & DE, 3750354, A	5, 6, 23, 24, 30, 31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
6 April, 1999 (06. 04. 99)Date of mailing of the international search report
13 April, 1999 (13. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

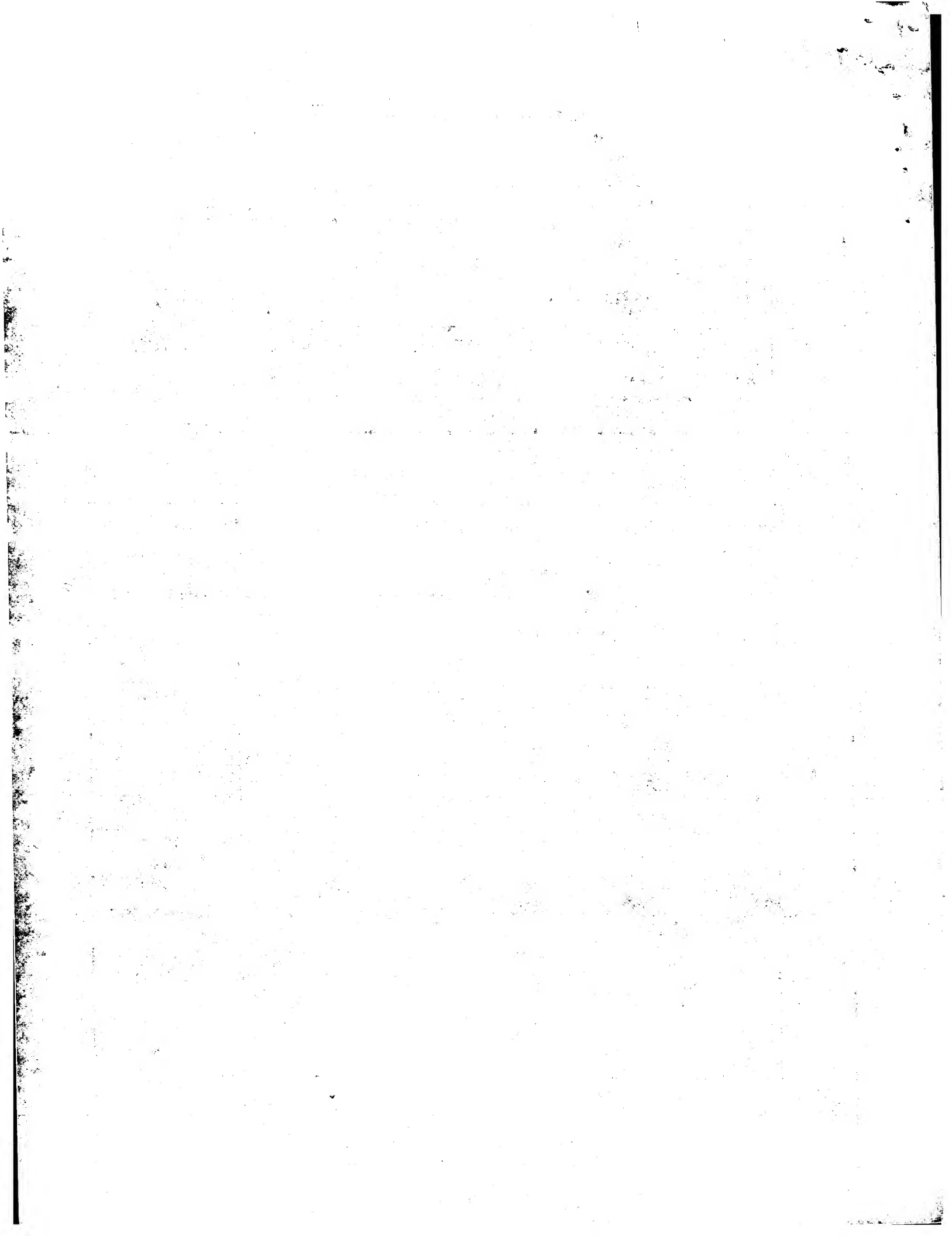
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 4-501605, A (Pharmacia Biosensor AB.), 19 March, 1992 (19. 03. 92) & SE, 8804073, A & WO, 9005303, A & EP, 589867, A & US, 5436161, A & DE, 68926255, A & AT, 136651, A	10
Y	JP, 10-267834, A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 9 October, 1998 (09. 10. 98) (Family: none)	12, 13
A	Bun Takeyama et al., "Kakunai juyoutai to koakuchibeetaa no sougo sayou o shiyou to shita hormone you kassei sokuteihou", Dai 24 kai Kankyou Tokisokorojii symposium, Dai 2 kai Eisei Yakugaku Forum Goudou Taikai Kouen Youshishuu (05. 98. 12) p81	1-32



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl^o G 01 N 33/543

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl^o G 01 N 33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JOIS、BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	H. Morgan & D. M. Taylor "A Surface plasmon resonance immnosensor based on the streptavidin-biotin complex", Biosensors & Bioelectronics, 7 (1992), p405-410	1, 3, 4, 7-9, 11, 14-19, 21, 22, 25, 26, 28, 29, 32
Y		2, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 20, 23, 24, 27, 30, 31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06.04.99

国際調査報告の発送日 13.04.99

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
竹中 靖典

2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 6630

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 1-109262, A (栄研化学株式会社) 26. 4月. 1989 (26. 04. 89) (ファミリーなし)	2, 4, 20, 22, 27, 29
Y	JP, 63-14691, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 21. 1月. 1988 (21. 01. 88) & EP, 251635, A & US, 479887, A & DE, 3750354, A	5, 6, 23, 24, 30 31
Y	JP, 4-501605, A (ファーマシア・バイオセンソル・アクチエボラーク) 19. 3月. 1992 (19. 03. 92) & SE, 8804073, A & WO, 9005303, A & EP, 589867, A & US, 5436161, A & DE, 68926255, A & AT, 136651, A	10
Y	JP, 10-267834, A (大日本印刷株式会社) 9. 10月. 1998 (09. 10. 98) (ファミリーなし)	12, 13
A	嶽山 文ら「核内受容体とコアクチベーターの相互作用を指標としたホルモン様活性測定法」第24回環境トキシコロジーシンポジウム・第2回衛生薬学フォーラム合同大会講演要旨集, (05. 98. 12) p81	1-32

09/622896

533 Rec'd PCT/PTO 31 AUG 2000

The following is the English translation of Annexes to the International Preliminary Examination Report Amended Sheets 63 & 65.

09-107-80
233 Rec'd 10-16-80

AMENDED SHEET

15. The sensor chip for surface plasmon resonance of claim 14, wherein the irradiation surface of the metallic thin film coats a substrate pervious to irradiated light.

16. The sensor chip for surface plasmon resonance of claim 1, having two or more of the antibodies against two or more of the antigens.

17. (Amended) A method for detecting an antigen, comprising the steps of:

exposing an antibody of a sensor chip for surface plasmon resonance to a sample, said sensor chip having a metallic thin film; one or more of the antibodies against one or more antigens selected from a steroid hormone, or a substance showing the same physiological action as that of a steroid hormone, a sex hormone, or a substance showing the same physiological action as that of a sex hormone, and an endocrine disruptor (excluding a triazine compound); and a fixing layer for fixing the antibody to the metallic thin film;

irradiating the metallic thin film with light; and detecting intensity of reflected light from the metallic thin film.

18. The method for detecting an antigen as claimed in claim 17, further including the step of finding a shift in a disappearance angle of the reflected light.

19. The method for detecting an antigen as claimed in claim 17, further including the step of binding a labeled antigen, which is the antigen bound to a labeling material, to the antibody before the exposing step.

Do not enter - 65 -
incomplete
translation

CLAIMS

1. (Amended) A sensor chip for surface plasmon resonance, comprising:
 - a metallic thin film;
 - one or more antibodies against one or more antigens selected from a steroid hormone, or a substance showing the same physiological action as that of a steroid hormone, a sex hormone, or a substance showing the same physiological action as that of a sex hormone, and an endocrine disruptor (excluding a triazine compound); and
 - a fixing layer for fixing the antibody to the metallic thin film.
2. The sensor chip for surface plasmon resonance of claim 1, wherein the antibody is an antibody against a steroid hormone, or against a substance showing the same physiological action as that of a steroid hormone.
3. The sensor chip for surface plasmon resonance of claim 1, wherein the antibody is an antibody against a sex hormone, or against a substance showing the same physiological action as that of a sex hormone.
4. The sensor chip for surface plasmon resonance of claim 1, wherein the antibody is an antibody against an estrogen.
5. The sensor chip for surface plasmon resonance of claim 1, wherein the antibody is an antibody against an environmental hormone having a cyclic hydrocarbon portion.
6. The sensor chip for surface plasmon resonance of

06165389d

3838e000000 31 000000